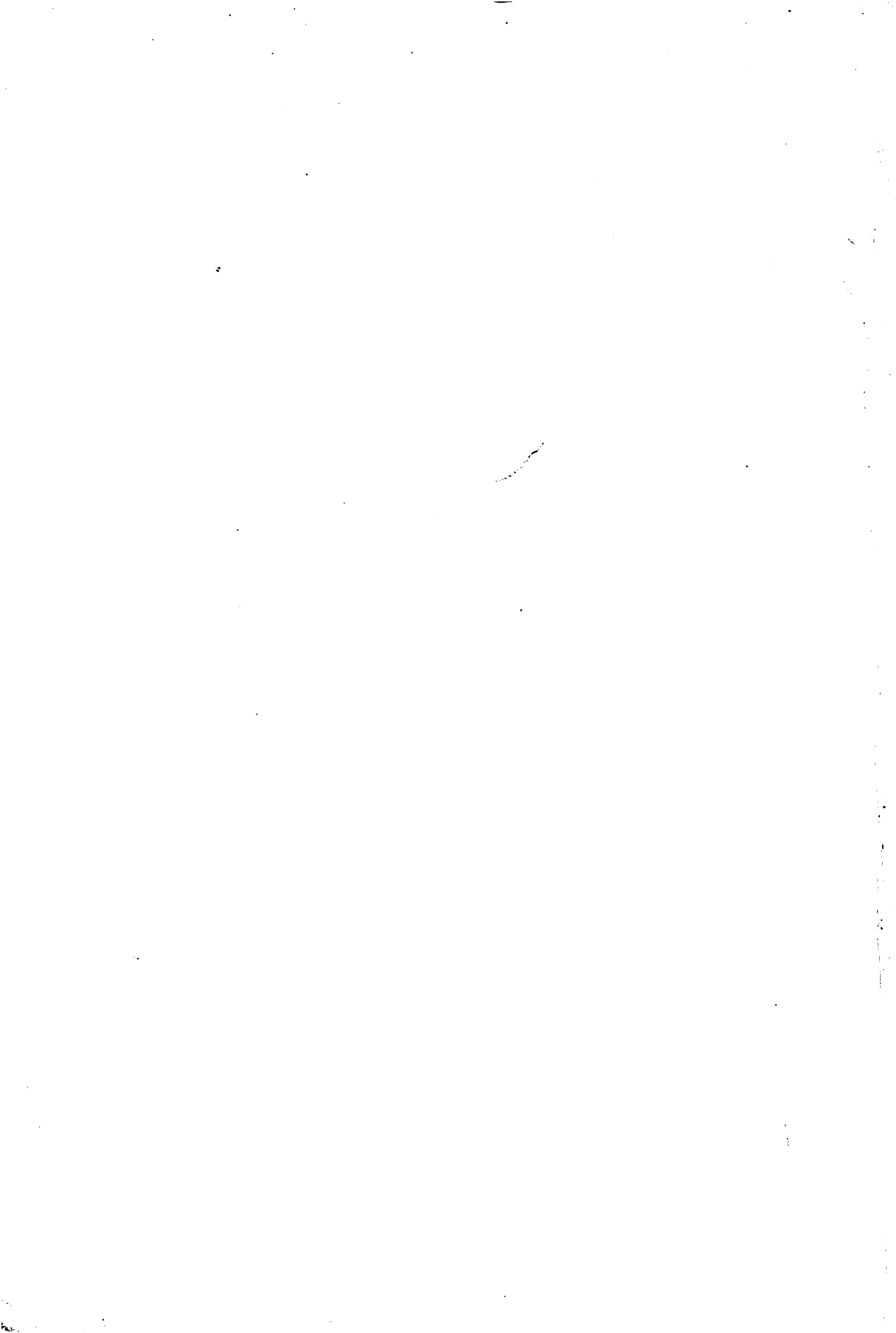


**DIVERSIDADE FENOTÍPICA E GENOTÍPICA
DE ISOLADOS DE *Pisolithus* spp.**

ANDERSON MARCOS DE SOUZA

2000



51081

MFV. 36007

ANDERSON MARCOS DE SOUZA

**DIVERSIDADE FENOTÍPICA E GENOTÍPICA
DE ISOLADOS DE *Pisolithus* spp.**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Engenharia Florestal, área de concentração em Manejo Ambiental, para obtenção do título de "Mestre".

Orientadora:
Prof^a Dulcinéia de Carvalho

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL
2000

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA**

Souza, Anderson Marcos de

Diversidade fenotípica e genotípica de isolados de *Pisolithus* spp. / Anderson
Marcos de Souza. -- Lavras : UFLA, 2000.

107 p. : il.

Orientadora: Dulcinéia de Carvalho.

Dissertação (Mestrado) – UFLA.

Bibliografia.

1. Ectomicorriza. 2. *Pisolithus*. 3. Diversidade. I. Universidade Federal de
Lavras. II. Título.

CDD-574.52482

-581.52482

ANDERSON MARCOS DE SOUZA

**DIVERSIDADE FENOTÍPICA E GENOTÍPICA
DE ISOLADOS DE *Pisolithus* spp.**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Engenharia Florestal, área de concentração em Manejo Ambiental, para obtenção do título de “Mestre”.

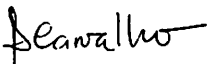
APROVADA em 19 de dezembro de 2000

Prof. Sebastião Carlos da Silva Rosado

UFLA

Prof. José Oswaldo Siqueira

UFLA


Prof.^a Dulcinéia de Carvalho
UFLA
(Orientadora)

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL

AGRADECIMENTOS

A Deus, por permitir que mais esta etapa seja alcançada.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e a CAPES pela oportunidade de realização do curso e concessão da bolsa de estudos.

À professora Dulcinéia de Carvalho, pela orientação, atenção e amizade ao longo deste trabalho.

Ao professor Sebastião Carlos da Silva Rosado, pelo apoio e amizade.

À todos os professores e funcionários do Departamento de Ciências Florestais da UFLA.

Aos amigos e companheiros do Laboratório de Melhoramento Florestal, em especial Nilza, Karem, Sheila, Carol, Vássia, Gabi, Alessandra, Fran, Vanete, Batmam, Floriana, Giu, Dôra, Eduardo e Joema.

Aos amigos Josina, Rejane, Edmilson, Rose, Edinho, Elisana, Adriana, Leticia, Edinho, Reginaldo, Alcivânia, Didi, Raquel e Andrea.

Aos demais colegas de curso e a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

Aos meus pais Marcos e Eunice.

A minha irmã Mara.

DEDICO

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	3
2.1 Micorrizas.....	3
2.2 Fungos Micorrízicos.....	5
2.2.1 Caracterização morfológica dos fungos ectomicorrízicos.....	11
2.2.1 Caracterização protéica de fungos micorrízicos.....	13
2.2.2 Caracterização isoenzimática de fungos ectomicorrízicos.....	16
2.3 Caracterização genética de fungos micorrízicos.....	19
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	22
3.1 Material biológico de <i>Pisolithus</i> spp. utilizados no estudo.....	22
3.2 Determinação do crescimento micelial.....	22
3.3 Características morfológicas.....	26
3.4 Isolamento e caracterização fenotípica dos isolados.....	27
3.5 Quantificação de proteína de isolados de <i>Pisolithus</i> spp.....	28
3.6 Eletroforese de proteínas.....	29
3.7 Caracterização isoenzimática.....	31
3.8 Eletroforese de isoenzimas.....	32
3.9 Marcador molecular – RAPD.....	34
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	36
4.1 Crescimento micelial.....	36
4.2 Caracterização morfológica.....	42
4.3 Caracterização protéica de isolados de <i>Pisolithus</i> spp.....	52
4.3.1 Quantificação da concentração protéica.....	52
4.3.2 Caracterização dos isolados por eletroforese monodimensional (1D-SDS PAGE).....	53
4.4 Caracterização isoenzimática.....	58
4.5 Diversidade genética de isolados de <i>Pisolithus</i> spp.....	66
4.6 Comparação de agrupamentos formados pelos diferentes marcadores.....	68
5. CONCLUSÕES.....	74
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	75
7. ANEXOS.....	95

RESUMO

SOUZA, A. M. **Diversidade Fenotípica e Genotípica de Isolados de *Pisolithus* spp.** Lavras: UFLA, 2001. 107p. (Dissertação – Mestrado em Engenharia Florestal)*

Pisolithus spp. é um fungo cosmopolita, que vive em simbiose com várias espécies arbóreas, principalmente *Eucalyptus* e *Pinus*. Com o objetivo de avaliar a diversidade fenotípica e genotípica de isolados de *Pisolithus* spp., procedentes do Brasil, USA e Canadá, foram utilizadas características morfológicas, marcadores bioquímicos (PAGE e SDS-PAGE) e molecular (RAPD) para a indicação de genótipos potenciais com ampla base genética a serem utilizados em programas de melhoramento da simbiose ectomicorrízica. Tanto as características morfológicas como os marcadores possibilitaram agrupar os isolados quanto a sua taxa de divergência, sendo que, para características morfológicas, esta taxa variou de 0 a 82% para marcador protéico de 9 a 80% e para marcador enzimático de 0 a 79%. De acordo com as características morfológicas, os cruzamentos aptos a ampliar a base genética foram P4 x P21 e P4 x P25, para o marcador protéico P10 x P31, P13 x P29, P13 x P30, P18 x P29 e P20 x P31, marcador enzimático P13 x P18 e P15 x P33. A análise comparativa dos agrupamentos obtidos pelos diferentes marcadores possibilitou a distinção dos isolados quanto à sua colonização ao hospedeiro. O marcador molecular (RAPD) demonstrou ser o mais indicado na avaliação de diversidade, isto devido a não sofrer a influência das condições de cultivo e trabalhar diretamente com o material genético.

* Comitê Orientador: Dulcinéia de Carvalho – UFLA (Orientadora), Sebastião Carlos da Silva Rosado – UFLA

ABSTRACT

SOUZA, A. M. **Phenotypic and Genotypic diversity of *Pisolithus* spp. Isolates.** Lavras: UFLA, 2000. 107p. (Dissertation – Master of Science in Forestry)*

Pisolithus spp. is a cosmopolitan fungus living in symbiosis with a number of tree species, mainly *Eucalyptus* and *Pinus*. Isolates from Brazil, USA and Canadá were used for the evaluation of the phenotypic and genotypic diversity of *Pisolithus* spp. Morphological, biochemical (PAGE and SDS-PAGE) and molecular (RAPD) markers were analysed for the identification of potential genotypes with broad genetic base that could be used in programs aiming the improvement of the ectomycorrhizal symbiosis. It was possible to group the isolates on the basis of morphological and molecular markers. The divergence rate for morphological markers ranged from 0 to 82%, whereas for protein ranged from 9 to 80% and for enzyme from 0 to 79%. The crosses apt to broaden the genetic base for morphological markers were P4 x P21 and P4 x P25, whereas for proteins were P10 x P31, P13 x P29, P13 x P30, P18 x P29 and P20 x P31, and enzymes were P13 x P18 and P15 x P33. The distinction of the isolates in relation to their colonization to the host was mad possible by comparative analysis of the groups obtained throught the different molecular markers. RAPD was the most indicated marker for evaluation of diversity, considering that it was no influenced by the cultivation conditions, having a direct link with the genetic material.

* Guidance Committe: Dulcinéia de Carvalho – UFLA (Adviser), Sebastião Carlos da Silva Rosado – UFLA

1 INTRODUÇÃO

A degradação dos ecossistemas naturais e o uso inapropriado do solo são os principais agentes de desertificação e degradação de diferentes regiões do planeta.

Face a esta situação, o reflorestamento é uma atividade que além de conter este fenômeno de desertificação, contribui para a restauração e restabelecimento dos ecossistemas naturais degradados. Aliadas a esta atividade, várias estratégias vêm sendo utilizadas com o intuito de amenizar o impacto de fatores estressantes sobre as espécies vegetais cultivadas, dentre elas destacam-se os programas de melhoramento genético através da seleção de genótipos superiores.

Tanto o melhoramento genético de plantas como o melhoramento genético de simbioses capazes de sobreviver, crescer e produzir em sítios desfavoráveis são de grande importância no restabelecimento e restauração destas áreas.

Pisolithus spp. é um fungo ectomicorrízico cosmopolita, que vive em simbiose com várias espécies de árvores, principalmente com as do gênero *Eucalyptus* e *Pinus*. Esta simbiose é de grande importância para as árvores hospedeiras, principalmente quando plantadas em sítios de baixa fertilidade, pois o parceiro fúngico melhora a absorção e o transporte de água e nutrientes do solo, aumenta a tolerância à acidez, à toxidez de metais pesados, a temperaturas elevadas do solo e aumenta a resistência às doenças do sistema radicular.

O sucesso de qualquer programa de micorrização é, sem dúvida, influenciado pela estrutura, variabilidade e estratégia reprodutiva destas populações naturais de fungos. Desta forma, estudos genéticos são necessários para conhecer a magnitude desta variabilidade para a melhor compreensão das

características ecológicas e fisiológicas, que permitirão o estabelecimento de novas estratégias de melhoramento genético.

E para acessar esta variabilidade é indispensável o uso de marcadores morfológicos e genéticos, que possibilitarão caracterizar, identificar e avaliar o comportamento de genótipos a serem utilizados em programas de melhoramento da simbiose.

Diante de tal fato, os objetivos deste estudo foram estudar a diversidade fenotípica e genotípica de isolados de *Pisolithus* spp. por meio de características morfológicas, marcadores bioquímicos (PAGE, SDS-PAGE), molecular (RAPD) e comparar a variabilidade obtida por estes diferentes procedimentos, visando detectar e selecionar genótipos de ampla base genética aptos a serem utilizados em programas de melhoramento da simbiose ectomicorrízica.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Micorrizas

A simbiose mais comum em plantas superiores é a associação micorrízica estabelecida entre determinados fungos do solo e radículas de plantas (Marx, 1977).

Cerca de 95% das espécies de plantas formam associações micorrízicas na natureza (Trappe, 1977), com exceção de algumas famílias como Cruciferae, Chenopodiaceae, Saxifragaceae, dentre outras, que incluem também a maior parte das plantas aquáticas, parasitas e carnívoras (Pate, 1994). As micorrizas representam um fenômeno de ocorrência generalizada resultante da união orgânica entre as raízes e o micélio de fungos pertencentes a diversas espécies de Ascomycetes, Basidiomycetes e Zigomicetes (Trappe, 1977; Siqueira e Franco, 1988). Tradicionalmente, as micorrizas têm sido classificadas com base na anatomia da infecção em ectomicorrizas, micorrizas arbusculares e ectendomicorrizas. As micorrizas arbusculares são caracterizadas pela penetração inter e intracelular do micélio fúngico no córtex da raiz. Intracelularmente é formada uma estrutura específica para troca de metabólitos denominada arbúsculo. Este tipo de micorriza é formada entre a maioria das Angiospermas e algumas Gimnospermas e Fungos Zigomicetes da ordem Glomales (Morton e Benny., 1990; Harley e Smith, 1983). As ectomicorrizas são caracterizadas pela penetração intercelular do micélio fúngico no córtex da raiz (rede de Hartig) e formação de um manto fúngico ao redor das raízes colonizadas. São formadas principalmente entre fungos Basidiomycetes e alguns Ascomycetes e a maioria das Gimnospermas e algumas Angiospermas. Nas ectendomicorrizas, o manto é reduzido e muitas vezes ausente. A rede de Hartig

é bem desenvolvida e apresenta penetração intracelular do micélio. São produzidas entre os mesmos fungos ectomicorrízicos e plantas hospedeiras em condições específicas (Harley e Smith, 1983; Siqueira e Franco, 1988). Do ponto de vista ecológico, as ectomicorrizas e as micorrizas arbusculares são consideradas as mais importantes (Siqueira e Franco, 1988).

As ectomicorrizas formadas por fungos basidiomicetos e ascomicetos correspondem a apenas 5% das espécies de plantas vasculares, incluindo espécies florestais e ornamentais. Todas as espécies são das famílias Pinaceae, Fagaceae, Betulaceae, Salicaceae, Tiliaceae e muitos membros Rosaceae, Leguminosae, Ericaceae, Junglandaceae, outras são ectomicorrízicas (Trappe, 1977). As espécies arbóreas ectomicorrízicas comercialmente importantes incluem as famílias Betulaceae, Dipterocarpaceae, Fagaceae, Myrtaceae e Pinaceae (Castellano, 1994).

A penetração e colonização das raízes pelos fungos ectomicorrízicos resultam em modificações na fisiologia, bioquímica e nutrição da planta hospedeira, aumentando a taxa fotossintética, absorção, translocação e utilização de nutrientes minerais e água e alterações na morfologia e taxa de crescimento das raízes (Harley e Smith, 1983; Siqueira e Franco, 1988). Em adição ao papel nutricional, os fungos podem deter patógenos das raízes, proteger as plantas contra toxinas radiculares e promover o crescimento das mudas através da produção de hormônios (Trappe, 1977). A natureza e magnitude destas alterações depende da relação de compatibilidade entre os componentes do sistema, o que pode ocorrer pelo grau de especificidade que existe entre alguns fungos simbiotes e os seus hospedeiros. Algumas plantas hospedeiras parecem ser mais seletivas para seus fungos simbiotes (Duddridge, 1987).

Os fungos simbiotes também apresentam um certo grau de especificidade, mais em nível de gênero, e poucas associações ectomicorrízicas específicas têm sido relatadas (Duddridge, 1987).

Com relação à especificidade, os fungos ectomicorrízicos foram divididos em três categorias: fungos com grande potencial ectomicorrízico, baixa especificidade e que frutificam naturalmente, como *Thelephora terrestris*, *Cenococcum gramiforme*, *Paxilus involutus*, *Pisolithus tinctorius*, *Laccaria laccata* e *Amanita muscaria*; fungos com médio potencial ectomicorrízico, com certa especificidade, frutificação limitada e dependentes do hospedeiro, como *Suillus lakei* x *Pseudotsuga menziesii*, *Rhizopogon vinicolor* x *Pinus* sp; e fungos com baixo potencial ectomicorrízico, formando micorriza apenas com uma espécie hospedeira, como *Suillus* spp. e *Rhizopogon* spp. que são específicos para coníferas, *Alpova diplophloeus* para *Alnus* spp e *Hydnangium carneum* para *Eucalyptus* spp (Molina e Trappe, 1982).

Hoje a seleção cuidadosa do fungo é reconhecida como um passo importante nos programas de inoculação em viveiros. Fungos ectomicorrízicos diferentes podem afetar a planta hospedeira de formas distintas. Algumas diferenças entre os fungos ectomicorrízicos incluem a especificidade do fungo ao hospedeiro, adaptabilidade ecológica do fungo, capacidade de absorção e translocação de nutrientes, produção de reguladores de crescimento e interações com outros organismos do solo. A variação ecotípica dentro de uma espécie fúngica pode ser tão pronunciada como as diferenças entre as espécies de plantas, isto implica maiores estudos de variabilidade para uma seleção mais efetiva de genótipos superiores a determinados hospedeiros.

2.2 Fungos ectomicorrízicos

A evolução do hábito saprofítico para o ectomicorrízico parece ter ocorrido convergentemente em diferentes ocasiões (Bruns, White e Taylor, 1991; Bruns et al., 1998). Embora um único registro fóssil esteja disponível, datado de 50 milhões de anos (eoceno) (Le Page et al., 1997), dados moleculares

sugerem que os fungos ectomicorrízicos surgiram há 130 milhões de anos (cretáceo), coincidindo com as primeiras evidências fósseis da família Pinaceae (Berbee e Taylor, 1993). Sua predominância nessa família seria responsável pelo sucesso de seus membros em grande variedade de *habitats* com grande amplitude climática e edáfica (Malloch et al., 1980 citado por Le Page, 1997).

As ectomicorrizas são encontradas predominantemente em plantas lenhosas e em regiões temperadas, em particular nas famílias Pinaceae (95%), Fagaceae (94%), Betuliaceae (70%) e Salicaceae (83%). O *status* ectomicorrízico predomina, também, em duas outras famílias em diferentes condições climáticas: Myrtaceae (90%) e Dipterocarpaceae (98%). As ectomicorrizas têm sido encontradas em menor proporção nas famílias Leguminosae (16%), Rosaceae (12%), Euphorbiaceae (7%), Scrophulariaceae (4%), Rubiaceae (3%) e Cyperaceae (3%) (Wilcox, 1990).

A ocorrência dessa simbiose em plantas nativas de florestas tropicais parece ser rara, como apontam resultados em diferentes países (Redhead, 1982; Le Tacon, Garbaye e Carr, 1987; Béreau e Garbaye, 1994). Exceção para essa regra é representada por algumas florestas do Sudeste asiático, onde predominam as Dipterocarpaceae, com grande número de espécies ectomicorrízicas, e de certas formações vegetais na África, com leguminosas da subfamília Caesalpinoideae. No Brasil, informações sobre o *status* micorrízico de plantas nativas são escassas. Singer e Araújo (1979) observaram a presença de fungos e de ectomicorrizas em plantas da Amazônia, e Thomazini (1974) verificou a presença de ectomicorrizas em plantas nativas do Cerrado. Resultados preliminares obtidos na Mata Atlântica e na Floresta de Araucária, em Santa Catarina, sugerem ausência dessa associação em plantas nativas das duas formações vegetais (Andrade, Oliveira e Queiroz, 1998).

A raiz, quando associada com fungos micorrízicos, é caracterizada pela presença de três componentes estruturais: o revestimento do manto fúngico

envolvendo a raiz, a formação de um “labirinto” da hifa entre as células corticais, chamado de rede de Hartig, e o crescimento externo da hifa, formando conexões essenciais com o solo e com os corpos de frutificação dos fungos, formando as ectomicorrizas.

Estima-se que 3% das fanerógamas sejam ectomicorrizadas (Meyer, 1973); sua importância global é grandemente estudada devido a sua ocorrência na superfície terrestre e também devido ao seu potencial econômico em produzir madeira.

Em contraste à situação que ocorre com as micorrizas arbusculares, um grande número de espécies de fungos têm sido registrados como fungos ectomicorrízicos. Molina, Massicote e Trappe (1992) estimam que entre 5000 e 6000 espécies de fungos formam ectomicorrizas ou ectendomicorrizas. A maior parte destes é do tipo epígeo (aproximadamente 4500) e os demais, representando um quarto, são hipógeos.

Vários estudos têm advertido quanto à existência de variabilidade interespecífica entre os fungos ectomicorrízicos na estrutura, função e também na forma destes fungos. Expressiva variabilidade é encontrada para *Pisolithus tinctorius* (Lamhamedi, et al. 1990; Lamhamedi e Fortin, 1991; Burgess, Dell e Malajczuk, 1994; Burgess et al., 1995), *Laccaria bicolor* (Kropp, McAfee e Fortin, 1987; Wong et al., 1989 e Wong, Piché e Fortin, 1990) e *Hebeloma cylindroporum* (Debaud, Gay e Bruchet, 1986 e Marmeisse, Debaud e Casselton, 1992).

Em vista do grande sucesso do trabalho pioneiro de Marx et al. (1989) e Marx, Maul e Cordell, (1992) na aplicação de fungos ectomicorrízicos em silvicultura, os estudos sobre ectomicorrizas no Brasil e em outros países tropicais têm dado grande ênfase à espécie *Pisolithus tinctorius*, adotando-se o nome dessa espécie norte-americana [*P. tinctorius* (Pers.) Coker e Couch = *P. arhizus* (Pers.) Rauschert] para as espécies que ocorrem naqueles países (Imaña

e Prado Junior., 1973; Soares et al., 1989, 1990; Ba e Thoen, 1990; Bougher e Malajczuk, 1990; Cahn e Griffiths, 1991; Aggangan et al., 1996; Jughans et al., 1998). Entretanto, o *Pisolithus* americano parece ser específico de coníferas, enquanto, no Brasil, as frutificações e micorrizas de *Pisolithus* ocorrem especificamente em plantações de *Eucalyptus* spp. Provavelmente, essas sejam de origem australiana, introduzidas acidentalmente com material vegetal importado daquele país. Diante deste fato, certas espécies de *Pisolithus* têm sido incorretamente denominadas de *P. tinctorius* (Anderson, Chambers e Cairney, 1998), correspondendo às espécies *Pisolithus albus* (Cooke e Masee) Priest, *nom. prov.*, *Pisolithus marmoratus* (Berkeley) Priest, *now. Prov.*, *Pisolithus microcarpus* (Cooke e Masee) Cunn. (Cunningham, 1942) que, na Austrália, encontram-se, também, associadas especificamente a *Eucalyptus* spp. (Anderson, Chambers e Cairney, 1998; Bougher e Syme, 1998), ou *Pisolithus aurantioscabrous* Watl., descrita em florestas tropicais na Malásia, *P. Kisslingi* E. Fisch, na Sumatra, e *P. pusillum* Pat. (Watling et al., 1995), ou a espécies ainda não descritas.

Pisolithus microcarpus tem sido a espécie encontrada nas plantações de *Eucalyptus* spp., entre as identificadas até o momento, em Santa Catarina (Giachini e Oliveira, 1996). Há, assim, uma necessidade urgente de proceder a correta identificação dessas espécies no Brasil para evitar interpretações confusas sobre resultados de estudos aqui desenvolvidos

Os fungos ectomicorrízicos são, em sua maioria, basidiomicetos superiores e possuem duas fases distintas no ciclo de vida. A primeira inicia-se com a germinação do esporo, formando o micélio primário monocariótico ou homocariótico. A partir deste momento, inicia-se a segunda fase, caracterizada pelos eventos morfogenéticos que originam o micélio dicariótico, predominante na natureza e dotado da capacidade de formar ectomicorrizas em maior

proporção que o micélio monocariótico e produzir corpos de frutificação (Lamhamedi et al., 1990).

Na formação da fase dicariótica, o fenômeno essencial é a fusão de dois micélios monocarióticos compatíveis, seguida pelos eventos morfogênicos constituídos pela migração nuclear, formação de grampos de conexão celular, divisão celular e fusão dos grampos de conexão (Casselton e Economou, 1985).

A fusão entre micélios compatíveis é regulada pela ação de genes que determinam a compatibilidade sexual que, dependendo da espécie, pode ser do tipo bipolar – controlada por um único genes com múltiplos alelos – ou tetrapolar – controlada por dois genes, A e B, possuindo, cada um, múltiplos alelos.

Tanto no sistema bipolar quanto no tetrapolar, a compatibilidade requer que os alelos sejam diferentes; para o tetrapolar, tal requerimento deve prevalecer nos dois genes.

Os estudos de compatibilidade sexual conduzidos em *P. tinctorius*, *Hebeloma cylindrosporum*, *Suillus bovinus*, *S. granulatus*, *S. luteus*, *Laccaria bicolor*, *L. laccata* e *L. proxima* mostraram que nestes fungos ectomicorrízicos o sistema de compatibilidade é do tipo tetrapolar (Fries e Muller, 1984; Gay e Debaut, 1987; Kope e Fortin, 1990; Fries & Sun, 1992; Rosado, Krop e Piché, 1994; De la Bastide, Kropp e Piché., 1995b). O reconhecimento da compatibilidade sexual nos fungos ectomicorrízicos permite a condução de estudos de estrutura genética de populações, variabilidade fenotípica e genotípica inter e intrapopulacional (De la Bastide, Kropp e Piché, 1995 a e b), distribuição espacial e tempo de persistência de genótipos fúngicos na colonização radicular (De la Bastide, Kropp e Piché, 1994).

No Brasil, Barros, Brandi e Reis (1978) relataram a presença de *Pisolithus* sp. e *Scleroderma* sp. em associação com *E. grandis*, *E. robusta*, *E. microcorys* e em mais dez outras espécies de *Eucalyptus*. Em São Paulo, Yokomizo e Krügnner (1985) observaram que o *Pisolithus* sp. foi o fungo

simbionte encontrado com maior frequência em florestas de *E. grandis*, *E. saligna* e *E. vininalis*. Em Minas Gerais, Coelho (1993) constatou a ocorrência de *Pisolithus* sp., *Scleroderma uruguanensis* e *S. boavista* em povoamentos de *E. camaldulensis*. No estado do Espírito Santo, Guimarães (1993) constatou em plantações de *E. grandis* a ocorrência de *Pisolithus* sp., *Telephora terrestris*, *Clavária* sp. e *Scleroderma* sp., sendo que *Pisolithus* foi o simbionte mais freqüente. Embora tenham sido observados todos estes gêneros de fungos formando ectomicorrizas em eucalipto, a maior parte dos estudos tem se voltado para o gênero *Pisolithus*. Isto se deve à sua habilidade em colonizar um grande variedade de hospedeiros (Marx, 1977; Barros, Brandi e Reis, 1978; Coelho, 1993; Burgess, Dell e Malajczuk, 1994; Cairney e Chambers, 1997).

Garbaye (1990), estudando a inoculação controlada de diferentes essências florestais e diferentes fungos ectomicorrizicos, encontraram aumentos expressivos de altura que variam de 10% a mais de 400%, sendo mais freqüentes os casos nos quais os ganhos foram da ordem de 20%. Dos 25 casos analisados, em apenas quatro não foram obtidos ganhos significativos no crescimento de plantas inoculadas em relação às testemunhas. Segundo o autor, se os dados fossem extrapolados para o volume da parte aérea, seriam encontrados aumentos de 40% nesse parâmetro. Além disso, considerando-se que a estimulação foi obtida em estágio juvenil, aumentos dessa magnitude são de importância econômica considerável. A predominância dos efeitos positivos e sua ordem de magnitude confirmam o enorme potencial do controle da micorrização para os sistemas de produção de mudas no setor florestal.

A alta diversidade morfológica e fisiológica existente entre os fungos ectomicorrizicos explica as diferenças em efetividade ou eficiência micorrizica observadas em programas de inoculação (Harley e Smith, 1983). Diferentes espécies fúngicas ou isolados de uma mesma espécie se comportam de forma diferente quando em associação com várias espécies hospedeiras, podendo

apresentar um efeito benéfico variável ou até mesmo deletério sobre o crescimento e desenvolvimento da planta. Portanto, considerando a grande diversidade fisiológica e morfológica existente entre os fungos ectomicorrízicos, é possível esperar variações no comportamento desses fungos durante o desenvolvimento e estabelecimento da simbiose e na efetividade dessa simbiose em programas de inoculação. Esta variabilidade pode ser conhecida pela utilização de marcadores morfológicos e / ou genéticos.

2.2.1 Caracterização morfológica dos fungos ectomicorrízicos

Os fungos basidiomicetos são representados por várias espécies, estas adaptadas a diferentes nichos ecológicos, saprófitas, patógenos e simbiontes.

As populações biológicas dos basidiomicetos são estabelecidas em um dado ecossistema, a partir de diferentes mecanismos, e estes diretamente influenciam e mantêm a integridade genética do micélio. Estas populações são inicialmente estabelecidas pela dispersão dos basidiosporos ou pelo inóculo vegetativo. Crescimento micelial, recursos disponíveis e interações individuais ajudam a compreender e caracterizar o comportamento destas populações de fungos (Carlile, 1987; Rayner, 1991).

Os basidiomicetos ectomicorrízicos são importantes elementos na comunidade de uma floresta (Fogel, 1981; Villeneuve, Grandtner e Fortin, 1989; Vogt, Publicover e Vogt, 1991) e sua principal característica é a simbiose fungo/raiz, o que incentiva novos estudos de ecologia e genética de várias populações. Portanto, informações preliminares como estrutura da população, variabilidade genética e estratégias de adaptação e reprodução devem ser estudadas, pois possibilitam compreender ainda mais a especificidade do simbiote.

Os fungos ectomicorrízicos formam uma associação mutualística simbiótica com raízes de uma ampla taxa de espécies de plantas lenhosas (Kendrich e Berch, 1985; Molina, Massicote e Trappe., 1992). Estes fungos têm demonstrado possuir uma alta variabilidade intraespecífica para diversas características, dentre elas: características morfológicas (Debaud et al., 1988; Wong e Fortin, 1990; Wong et al., 1989), fisiológicas (Gay et al., 1993; Ho, 1989; Kropp, 1990; Samson e Fortin, 1986), genéticas (Gardes et al., 1990; Gardes et al., 1991a; Gardes et al., 1991b; Henrion, Le Tacon e Martin, 1992, 1992; Jacobson, Miller e Tunner, 1993; Martin et al., 1991; Sen, 1990; Zhu et al., 1988), influência em colonizar a planta hospedeira e desenvolvimento micorrízico (Kropp, 1990; Kropp e Fortin, 1988; Lamhamedi et al., 1990; Le Tacon et al., 1992; Marx, 1991). Tal informação, tem sido documentada para diferentes gêneros de fungos ectomicorrízicos *Laccaria*, *Suillus*, *Hebeloma* e *Pisolithus*.

A variabilidade encontrada entre progênies monocarióticas de um único basidiospore e seu dicariótico sintetizado, tem sido descrita para algumas espécies (Gay, 1993; Kropp, 1990; Kropp e Langlois, 1990; Rosado, Kropp e Piché, 1994), sugerindo seu potencial de adaptabilidade para ambientes heterogêneos.

Estudos de melhoramento genético de fungos ectomicorrízicos têm explorado esta variabilidade como meta para a produção de isolados superiores, principalmente para sítios de reflorestamento (Kropp e Langlois, 1990; Marx, 1991; Perry, Molina e Amaranthus, 1987).

Nada se sabe sobre os genes específicos que regulam a simbiose micorrízica, todavia é possível usar a diversidade existente entre os diferentes hospedeiros e genótipos fúngicos para obter pistas relevantes sobre a regulação genética da simbiose (Kropp e Anderson, 1994).

Diferentes características morfológicas vêm sendo utilizadas nos estudos de variabilidade dos fungos ectomicorrízicos. Considerável variação morfológica e fisiológica tem sido observada entre isolados de *Pisolithus tinctorius*; taxa de crescimento (Ho, 1987; Burgess et al., 1995; Tibbet, Sanders e Cairney, 1998), cor da colônia (Molina, 1979; Burgess et al., 1995), atividade enzimática e produção de fitohormônio (Ho, 1987), nutrição de carbono (Cao e Crawford, 1993) e temperatura ótima para crescimento em condição axênica (Cline, France e Reid, 1987). Esta variabilidade morfológica e fisiológica sugere que *Pisolithus* spp. é mais diverso taxonomicamente do que o reconhecido atualmente.

Marcadores morfológicos, apesar de serem úteis em estudos de laboratório, são raros e pouco observados em populações naturais de fungos, envolvendo um número limitado de alelos, possuindo efeitos fenotípicos freqüentes.

Burgess et al. (1995), estudando 100 isolados de *Pisolithus*, encontraram variação com relação às características das colônias, morfologia dos basidiosporos e forma do basidiocarpo. Com base nas suas características fenotípicas, sete grupos foram encontrados, com similaridade de 50%. Variações marcantes foram detectadas quanto ao diâmetro, presença de espinhos e forma dos basidiosporos. Os basidiocarpos variaram quanto à forma e tamanho. Os autores observaram que estas variações estão diretamente relacionadas com a espécie hospedeira e a origem geográfica dos mesmos.

2.2.1 Caracterização protéica de fungos micorrízicos

Além das modificações ultra-estruturais, bioquímicas e fisiológicas que se verificam durante a formação de micorrizas, existem modificações na expressão gênica dos dois parceiros. A ocorrência de um fenótipo protéico

próprio dos tecidos simbióticos foi pesquisada nos componentes em polipeptídeos de raízes não micorrizadas, micorrizadas e de micélio de *Pisolithus tinctorius*, por eletroforese, possibilitando detectar a existência de polipeptídeos pré-existente em células radiculares ou fúngicas (Hilbert e Martin 1988; Hilbert, Costa e Martin, 1991; Carvalho, 1994).

A expressão do genoma microbiano resulta na síntese de cerca de 2.000 proteínas moleculares que constituem a célula microbiana. Estas moléculas formam um fonte de informação para a caracterização de microrganismos. Muitas técnicas têm sido desenvolvidas para a separação e caracterização destas proteínas, e uma delas é a eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) (De Bruijn et al., 1998).

Vários estudos mostram o potencial da eletroforese de proteína e isoenzimas na caracterização de diferentes isolados fungos ectomicorrízicos, *Pisolithus* (Burgess et al., 1995), *Suillus* (Zhu et al., 1988; Sen, 1990; Keller, 1992; Karkouri, Cleyet-Marel e Mousain, 1996). Outros estudos, também utilizando a eletroforese, foram realizados em fungos patogênicos, insetos e ácaros (Joslyn e Boucias, 1981; Boucias, McGoy e Joslyn, 1982; Maghrabi e Kish, 1987a e 1987b; Riba et al., 1986; Propawski et al, 1988; Cochrane et al., 1989), e bactéria fixadoras (Moreira et al, 1993; Dupuy et al., 1994; Pereira, 2000).

A eletroforese é uma técnica relativamente simples, rápida e de alto valor informativo, que consiste na separação de macromoléculas ionizadas de acordo com suas cargas elétricas, formas e pesos moleculares, através da migração em um meio suporte e tampões adequados sob a influência de um campo elétrico. Moléculas com carga negativa migram para polo positivo e moléculas com carga positiva migram para polo negativo (Weistermeier et al., 1993; Alfenas, 1998).

Diferentes meios suportes foram utilizados visando a caracterização de proteínas, através da mobilidade eletroforética; dentre os meios, destaca-se a eletroforese em gel de Poliacrilamida – PAGE, introduzida em 1950 (Anti, 1991) pela sua praticidade e por propiciar alta resolução.

Segundo Carraro (1990), a técnica SDS-PAGE, na qual o dodecil sulfato de sódio (SDS), um detergente aniônico, se liga às regiões hidrofóbicas de proteínas para separar a maioria em suas unidades componentes, faz com que as proteínas percam seu efeito de carga específica, separando-se devido às suas diferenças de pesos moleculares. A SDS-PAGE está entre as técnicas que permitem a melhor resolução de bandas, tornando possível a avaliação em nível qualitativo (ausência/presença) e quantitativo (diferença de concentração dos polipeptídeos existentes em uma amostra).

Após a separação física no gel, as proteínas são detectadas através de procedimentos de coloração apropriados, formando padrões de bandas. Proteínas com massas diferindo em cerca de 2% (diferença de cerca de 10 aminoácidos) podem geralmente ser distinguidas (Westermeyer et al., 1993).

Segundo Alfenas et al. (1991), a resolução em géis de poliacrilamida foi melhorada com a introdução, na década de sessenta, do sistema descontínuo, em que dois sistemas de géis, gel separador e gel concentrador, e de solução tampão dos géis (Tris-HCl) diferente daqueles dos eletrodos (Tris-glicina) são utilizados. Enquanto no gel concentrador as moléculas de proteína concentram-se numa banda estreita e compacta, no gel separador elas se separam de acordo com os respectivos tamanhos moleculares (peneiramento molecular).

Comparando-se com outras técnicas, a eletroforese em gel de poliacrilamida requer somente pequena quantidade de amostra, permite a análise simultânea de diversas amostras e confere rápida separação com alta resolução (Boultier, Thurman e Derbyshire, 1976). Eletroforese tem tido grande aplicação no estudo de proteínas com respeito à regulação genética e bioquímica,

propriedades físico-químicas, ontogenia, especificidade e papel fisiológico, caracterização e diversidade, entre outras.

Uma grande vantagem desta técnica é a reprodutibilidade de resultados, o que é conseguido desde que não haja mudanças na metodologia eletroforética, os extratos sejam preparados de um modo comum, a partir de órgãos comparáveis em um mesmo estágio de desenvolvimento, e que sejam submetidos à eletroforese de uma maneira idêntica (Verneti, 1983).

2.2.2 Caracterização isoenzimática de fungos ectomicorrízicos

Enzimas que são codificadas por alelos diferentes ou locos gênicos distintos freqüentemente possuem mobilidades eletroforéticas diferentes. Tais diferenças são atribuídas a variações na composição de aminoácidos da molécula, o que, por sua vez, depende da seqüência de nucleotídeos do DNA.

A análise de eletroforética de isoenzimas tem sido usada de forma intensa no estudos de genética de plantas (Tanksley e Orton, 1983), tem sido de grande valor na taxonomia e na genética de populações de fungos (Micales, Bonde e Peterson, 1986) e também tem sido usada em estudos de fungos micorrízicos.

A análise de isoenzimas é uma técnica de alto valor informativo, aplicada em vários ramos da fitopatologia e micologia (Alfenas, 1998).

Incompatibilidade somática, análise de isoenzimas e outros marcadores moleculares, têm sido usados para estudar a variação genética e analisar a estrutura de populações naturais de saprófitas (Thompson e Rayner, 1982; Holmer e Stelind, 1991), patógenos (Stelind, 1985) e fungos simbióticos (Sen, 1990; Gardes et al., 1990; Keller, 1992; Jacobson, Miller e Turner, 1993; Karkouri, Cleyet-Marel e Mousain, 1996; Timonem e Sen, 1998). A análise de

isoenzimas tem sido empregada para resolver controvérsias taxonômicas, identificar taxa desconhecidos, reconhecer e patentear linhagens fúngicas, estimar a variabilidade genética em populações, determinar a segregação alélica em progênies, traçar a origem de patógenos e caracterizar e identificar a condição nuclear e o nível de ploidia do organismo durante o ciclo vital (Burdon et al., 1988).

Isoenzimas podem ser usadas como marcadores para estimar a variabilidade em populações e espécies de fungos. São marcadores mais neutros que a virulência, desde que não sofram pressões seletivas fortes destes hospedeiros. Como marcadores genéticos, as isoenzimas são úteis para estudar a estrutura de populações, acompanhar o progresso de epidemias, traçar a origem de novas variantes patogênicas, analisar cruzamentos (Newton, 1987), e estabelecer relações entre o ciclo de vida e a condição nuclear do organismo (Silveira, 1996).

O nível de polimorfismo detectado por análise de isoenzimas varia amplamente entre espécies e populações fúngicas. Um fator fundamental a ser considerado na estimação de variabilidade genética é o número de indivíduos e de locos examinados. As melhores estimativas de polimorfismo são obtidas quando grande número de isolados e de enzimas é utilizado. Os resultados podem variar muito entre experimentos, se tamanho de amostras e de enzimas são empregados (Otrosina e Cobb Junior, 1987; Zambino e Harrington, 1989).

O padrão de isoenzimas tem sido usado como marcadores genéticos para avaliar cruzamentos e identificar híbridos oriundos do campo e de laboratório. Burdon, Marshall e Luig. (1981) empregaram a análise de isoenzimas para determinar que uma raça de *P graminis* f. sp. *Triticici*, comum na Austrália, era híbrido somático originário de outras raças. A análise de isoenzimas tem sido usada para estudar progênies de cruzamentos controlados em laboratório (May e Royse, 1982; Shattok, Tooley e Fry, 1986; Royse & May, 1987; Royse et al,

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material biológico de *Pisolithus* spp. utilizados no estudo

Este estudo foi realizado no Laboratório de Melhoramento Florestal do Departamento de Ciências Florestais, na Universidade Federal de Lavras (MG). Foram utilizadas culturas de diferentes isolados do fungo ectomicorrízico *Pisolithus* spp., sendo estas originárias de cruzamento com várias combinações de isolados monocarióticos [procedentes de Lavras – MG (MA1, MB2 e MB3), obtidos de acordo com Carvalho et al. (1997)], com isolados dicarióticos de diferentes procedências (USA – 270 ; BRASIL – MA1 x MB3, MB2 x MB3, I1, 441 e Canadá - H6), conforme tabela 3. Os cruzamentos com combinações diferentes foram realizados em placa de Petri contendo meio MMN modificado (Del la Bastide et al., 1995 a e b), com o intuito de detectar algumas interações vegetativas entre micélios de *Pisolithus* spp. (Figura 1).

3.2 Determinação do crescimento micelial

Dois discos de aproximadamente 9 mm de diâmetro, contendo micélio fúngico de cada isolado de *Pisolithus* spp, foram retirados das bordas de colônias já formadas. Estes foram transferidos assepticamente para placas de Petri contendo meio MMN solidificado (Tabela 4) e em seguida incubados em câmara de crescimento a 25°C, na ausência de luminosidade, durante 28 dias.

diferentes, mostraram uma maior diferença de mobilidade para fosfatase ácida entre os isolados do que entre as espécies de plantas hospedeiras. Uma análise similar de *Laccaria laccata* possibilitou a divisão de isolados em três grupos de hospedeiros estudados (Ho, 1987).

Métodos bioquímicos e moleculares, análise eletroforética de isoenzimas e técnicas baseadas em DNA têm sido aplicadas para estudar espécies de *Tuber* com o intuito de fazer identificação e também superar problemas ocasionados pela identificação baseada apenas em características morfológicas. A análise eletroforética de isoenzimas oriundas de frutificação de *Tuber* demonstra ser segura na caracterização de algumas taxas, isto pode ser também considerado para outras espécies de fungos ectomicorrízicos (Pacioni e Pomponi, 1989, 1991; Bullini et al., 1994).

2.3 Caracterização genética de fungos micorrízicos

Os estudos de ecologia sob condições naturais são mais difíceis, embora vários estudos *in vitro* tenham sido realizados com relação à fisiologia de fungos ectomicorrízicos (Smith, 1982; Hung e Trappe, 1983; Hilger, Thomas e Krause, 1986; Taber e Taber, 1987; Cline, France e Reid, 1987; Hutchison, 1990). A maioria das informações relacionadas com a comunidade fúngica baseia-se nos registros de desenvolvimento dos esporocarpos (Marmeisse, Debaud e Casselton, 1992). A identificação do fungo ectomicorrízico não é feita somente com base na morfologia da micorriza ou das hifas extra-matriciais (Harley e Smith, 1983). A identificação correta da espécie torna-se mais complexa em situação de laboratório, pois esses fungos não produzem corpos de frutificação em condição *in vitro* (Martin, Tommerrup e Tagu, 1994).

A identidade do fungo no estágio de micélio vegetativo permite a análise da estabilidade genética e da dispersão dos genótipos individuais no ambiente.

Também fornece informações sobre as modificações espaciais e temporais na comunidade simbiótica. Essas informações são particularmente importantes nas florestas em que, a partir dos dados observados, pode ser feito o melhor uso da espécie ou isolado que favoreça o crescimento e a sobrevivência de árvores em solos pobres (Marmeisse, Debaud e Casselton, 1992).

As variações nas características dos isolados de uma espécie de fungo micorrízico podem ser tão pronunciadas como as observadas entre duas espécies distintas (Trappe, 1977).

A diversidade ecológica e fisiológica apresentada pelos fungos ectomicorrízicos pode ser explicada em termos genéticos (Esser e Meinhardt, 1986). O estudo genético de qualquer microrganismo requer a presença na célula de caracteres ou marcadores definidos, facilmente detectáveis (Michelmore e Hulbert, 1987). A existência de diversidade e variabilidade genética em fungo ectomicorrízicos propicia a base para melhorar e selecionar isolados com características desejadas (Tommerup, 1992). Marcadores moleculares têm sido utilizados como ferramentas de auxílio na caracterização e nos estudos de fisiologia e de ecologia de fungos (Michelmore e Hulbert, 1987; Dela Bastide, Kropp e Piché, 1994, 1995 a e b; Battista et al., 1996; Junghans et al., 1998; Anderson, Chambers e Cairney, 1998; Martin, Hogberg e Nylund, 1998; Gomes et al., 1999). Entre os vários marcadores utilizados, o que se baseia na técnica de PCR (Saik et al., 1985 e 1988) utiliza oligonucleotídeos com seqüência de nucleotídeos única ou arbitrária de pequeno tamanho, nove ou dez nucleotídeos (Willians et al., 1990). Essas características fazem com que ocorra o pareamento desses oligonucleotídeos em diferentes regiões do genoma, gerando fragmentos de DNA amplificados de diferentes tamanhos.

Segundo Junghans et al. (1998), os marcadores RAPD podem ser utilizados na identificação da diversidade genética em populações nativas de fungos ectomicorrízicos e naqueles mantidos em coleções sobre condições *in*

vitro, permitindo seleção de genótipos que favoreçam a manutenção de ampla base genética, quando da utilização de programas de micorrização controlada. Outra possibilidade de utilização está na obtenção de marcadores RAPD relacionados com características fisiológicas de interesse, como a identificação de genes que codificam para enzimas envolvidas na assimilação de fósforo ou com genes que codificam proteínas envolvidas no processo de estabelecimento.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material biológico de *Pisolithus* spp. utilizados no estudo

Este estudo foi realizado no Laboratório de Melhoramento Florestal do Departamento de Ciências Florestais, na Universidade Federal de Lavras (MG). Foram utilizadas culturas de diferentes isolados do fungo ectomicorrízico *Pisolithus* spp., sendo estas originárias de cruzamento com várias combinações de isolados monocarióticos [procedentes de Lavras – MG (MA1, MB2 e MB3), obtidos de acordo com Carvalho et al. (1997)], com isolados dicarióticos de diferentes procedências (USA – 270 ; BRASIL – MA1 x MB3, MB2 x MB3, I1, 441 e Canadá - H6), conforme tabela 3. Os cruzamentos com combinações diferentes foram realizados em placa de Petri contendo meio MMN modificado (Del la Bastide et al., 1995 a e b), com o intuito de detectar algumas interações vegetativas entre micélios de *Pisolithus* spp. (Figura 1).

3.2 Determinação do crescimento micelial

Dois discos de aproximadamente 9 mm de diâmetro, contendo micélio fúngico de cada isolado de *Pisolithus* spp, foram retirados das bordas de colônias já formadas. Estes foram transferidos assepticamente para placas de Petri contendo meio MMN solidificado (Tabela 4) e em seguida incubados em câmara de crescimento a 25°C, na ausência de luminosidade, durante 28 dias.

TABELA 3 - Isolados de *Pisolithus* spp., origem e compatibilidade sexual de cruzamentos em cultura pura em meio MMN (Marx, 1969), utilizados neste estudo.

	Isolados	Origem	Hospedeiro	Mating types (ploidia)
P1	MA1	Brasil	<i>Eucalyptus</i>	A3B3(n)
P2	MB2	Brasil	<i>Eucalyptus</i>	A2B2(n)
P3	MB3	Brasil	<i>Eucalyptus</i>	A1B1(n)
P4	270	USA	<i>Pinus</i>	? (n + n)
P5	H6	Canadá	<i>Eucalyptus</i>	? (n + n)
P6	MA1 x 270(S3+)	-	<i>Eucalyptus e Pinus</i>	A3B3 + ? (n + n)
P7	MA1 x (MB2xMB3)(S4+)	Brasil	<i>Eucalyptus</i>	A3B3 + (A2B2+A1B1)
P8	MA1 x (MA1xMB3)(S3+)	Brasil	<i>Eucalyptus</i>	A3B3 + (A3B3+A1B1)
P9	MB2 x (MB2xMB3)(S4-)	Brasil	<i>Eucalyptus</i>	A2B2 + (A2B2+A1B1)
P10	MB2 x H6(S4+)	-	<i>Eucalyptus</i>	A2B2 + ? (n + n)
P11	MB3 x H6(S4-)	-	<i>Eucalyptus</i>	A1B1 + ? (n + n)
P12	MB2 x 270(S4+)	-	<i>Eucalyptus e Pinus</i>	A2B2 + ? (n + n)
P13	MB3 x 270(S4+)	-	<i>Eucalyptus e Pinus</i>	A1B1 + ? (n + n)
P14	MA1 x 270(Z1)	-	<i>Eucalyptus e Pinus</i>	A3B3 + ? (n + n)
P15	MB2 x (MB2xMB3)(Z1)	Brasil	<i>Eucalyptus</i>	A2B2 + (A2B2+A1B1)
P16	MB2 x H6(Z1)	-	<i>Eucalyptus</i>	A2B2 + ? (n + n)
P17	MB3 x H6(Z1)	-	<i>Eucalyptus</i>	A1B1 + ? (n + n)
P18	MB2 x 270(Z1)	-	<i>Eucalyptus e Pinus</i>	A2B2 + ? (n + n)
P19	MB3 x 270(Z1)	-	<i>Eucalyptus e Pinus</i>	A1B1 + ? (n + n)
P20	MB2 x MB3 (Z1)	Brasil	<i>Eucalyptus</i>	A2B2 + A1B1
P21	MA1 x MB3 (Z1)	Brasil	<i>Eucalyptus</i>	A3B3 + A1B1
P22	MA1 x MB2 (Z1)	Brasil	<i>Eucalyptus</i>	A3B3 + A2B2
P23	MA1 x H6(Z1)	-	<i>Eucalyptus</i>	A3B3 + ? (n + n)
P24	MA1 x 441(Z1)	-	<i>Eucalyptus</i>	A3B3 + ? (n + n)
P25	MA1 x 11(Z1)	Brasil	<i>Eucalyptus</i>	A3B3 + ? (n + n)
P26	MB2 x 441(Z1)	-	<i>Eucalyptus</i>	A2B2 + ? (n + n)

“... continua ...”

“TABELA 1. Cont. “

P27	MB2 x 11(ZI)	Brasil	<i>Eucalyptus</i>	A2B2 + ? (n + n)
P28	MB3 x 441(ZI)	-	<i>Eucalyptus</i>	A1B1 + ? (n + n)
P29	MB3 x 11(ZI)	Brasil	<i>Eucalyptus</i>	A1B1 + ? (n + n)
P30	H6 x 441(ZI)	-	<i>Eucalyptus</i>	? (n + n) + ? (n + n)
P31	H6 x 11(ZI)	-	<i>Eucalyptus</i>	? (n + n) + ? (n + n)
P32	441 x 11(ZI)	-	<i>Eucalyptus</i>	? (n + n) + ? (n + n)
P33	270 x H6(ZI)	-	<i>Eucalyptus e Pinus</i>	? (n + n) + ? (n + n)
P34	270 x 441(ZI)	-	<i>Eucalyptus e Pinus</i>	? (n + n) + ? (n + n)
P35	270 x 11 (ZI)	-	<i>Eucalyptus e Pinus</i>	? (n + n) + ? (n + n)
P36	11	Brasil	<i>Eucalyptus</i>	? (n + n)
P37	441	Brasil	<i>Eucalyptus</i>	? (n + n)

(n) – isolado monocariótico; (n + n) – isolado dicariótico e ? mating type desconhecido

Durante 4 semanas foram feitas medições de diâmetro para avaliar o crescimento micelial de cada isolado. A cada 7 dias foi realizada uma medição, utilizando 4 repetições para cada isolado. Os dados obtidos foram submetidos a análise estatística pelo programa GENES (Cruz, 1997) . Inicialmente realizaram as análises de variância para o crescimento, utilizando o delineamento inteiramente casualizado. Em decorrência de significância entre os isolados, procedeu-se o estudo de comparação de médias pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Nas quatro avaliações (7, 14, 21 e 28 dias de cultivo) foram estimados os parâmetros genéticos, variação fenotípica, variação ambiental, variação genotípica e herdabilidade.

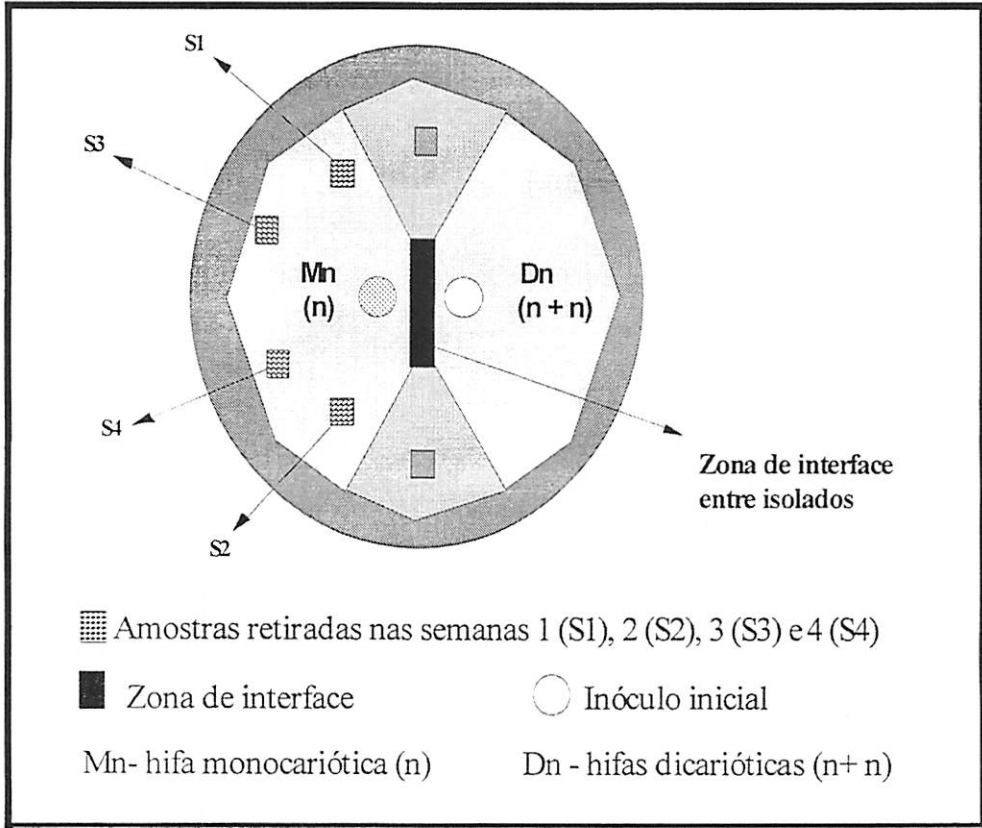


FIGURA 1 - Representação esquemática de cruzamentos em cultura pura em meio MMN. Áreas próximas do desenvolvimento de hifas dicarióticas e pontos amostrais são indicadas.

TABELA 4 – Composição do meio de cultura Melin-Norkrans (Marx, 1969) modificado.

Componentes	Quantidade/Litro
Solução estoque A [20X]	25 ml
CaCl ₂ .2H ₂ O	1.32 g
NaCl	0.5 g
KH ₂ PO ₄	10 g
Solução estoque B [20X]	25 ml
(NH ₄) ₂ HPO ₄	5 g
Solução estoque C [20X]	25 ml
MgSO ₄ .7H ₂ O	3 g
Extrato de Malte	3 g
Glicose	10 g
Ágar	10 g
Citrato Férrico (1% para 1 litro)	3 ml
Tiamina (filtrada separadamente)	0.2 ml

* pH ajustado a 5.5 antes de autoclavado (20 minutos à 120 °C).

3.3 Características morfológicas

Para a caracterização morfológica dos isolados foram avaliadas 11 características listadas na Tabela 5, e para cada característica utilizaram-se 10 repetições.

As avaliações possibilitaram construir uma tabela descritiva de todas as características morfológicas para os isolados estudados, e a partir desta foi feito o estudo de similaridade entre os isolados, usando o agrupamento pelo método UPGMA (unweighted pair-group method, arithmetic average, Rohlf, 1992), utilizando programa STATISTICA 5.0 (Slice, Kim e Walker, 1994).

TABELA 5 - Características utilizadas na análise morfológica de *Pisolithus* spp. conforme Burgess et al. (1995).

Características avaliadas	Taxas comparativas
Textura	Ausente; aveludada; flutuante; floculenta; áspera
Formação de cordão	Ausente ou presente
Cor do ágar	Colorido ou não colorido
Formação de halo	Ausente ou presente
Forma da colônia inferior	Submersa, aérea ou grudada
Forma da colônia superior	Submersa, aérea ou grudada
Margem da colônia	Regular ou irregular
Cor da colônia	Creme, amarelo, amarelo escuro, ocre ou marrom
Peso (mg/dia)	Baixo (< 3), médio (3 - 6) e alto (> 6)
Crescimento (mm/dia)	Baixo (< 1.5) e alto (> 1.5)
Densidade (mg/mm)	Baixo (< 3.0), médio (3 - 6) e alto (> 6.0)

3.4 Isolamento e caracterização fenotípica dos isolados

Aos 28 dias de cultivo em meio MMN (Marx, 1969), o micélio de cada isolado foi coletado e pesado. A extração de proteína foi feita com 0,1 g de micélio, com a ajuda nitrogênio líquido e hastes plásticas diretamente em eppendorf®. Após a obtenção do macerado, foram adicionados 500 µL de tampão de extração (Tabela 6). As amostras foram centrifugadas a 12.000 rpm por 20 minutos a 4°C. Destas amostras, 200 µL foram precipitados em 800 µL de acetona 80% (v/v). Em seguida, foram centrifugadas a 12.000 rpm por 20 minutos a 4°C e lavadas com acetona 80% (v/v). Finalmente, as amostras foram centrifugadas, o sobrenadante descartado e o “pellet” colocado para secar em dessecador por 12 horas.

Depois de seco, o pellet foi ressuspensão com 100 µL de tampão Laemmli (Tabela 7). A desnaturação foi feita a 60°C por uma hora e, a seguir, as amostras foram armazenadas a - 20°C, até o momento da quantificação.

TABELA 6 - Tampão de extração de proteínas de fungos (Burgess et al., 1995).

Componentes	Quantidade
Tris HCl pH7.5	50 Mm
PMSF	1 Mm
β - Mercaptoetanol	3 mM
Ácido Ascórbico	1 mM
EDTA	1 mM
Triton x 100	0.1%
PVP-solúvel (MW 22500)	10%

TABELA 7 - Tampão de solubilização de proteínas (Laemmli, 1970).

Componentes	Quantidade
Tris HCl 0.5M pH 6.8	1.0 mL
Glicerol	0.8 mL
SDS - 10%	4.0 mL
β - Mercaptoetanol	0.4 mL
Azul de bromofenol	0.2 mL
Água destilada	2.8 mL
Total	8 mL

3.5 Quantificação de proteína de isolados de *Pisolithus* spp.

A dosagem foi realizada utilizando duas repetições de cada isolado. O método utilizado para dosagem foi o de Bradford (1976), que foi adaptado de modo a dosar diretamente as proteínas do tampão de solubilização utilizado pela eletroforese. Este método apresenta a vantagem de ser sensível a fracas quantidades de proteínas.

Na dosagem, utilizaram-se 2 μ L da amostra, 1598 μ L de água bidestilada e 400 μ L do reativo de Bradford (kit da Bio Rad).

A curva padrão foi realizada com os seguintes pontos:

Pontos	0	0.5	1	2	4	6	8	10
BSA (1:10) – (µL)	-	80	160	320	640	960	1280	1600
H ₂ O bidestilada (µL)	1600	1480	1440	1280	960	640	320	-
Bio Rad (Corante) (µL)	400	400	400	400	400	400	400	400
Total (µL)	2000	2000	2000	2000	2000	2000	2000	2000

Os dados obtidos foram submetidos a análise estatística pelo programa GENES (Cruz, 1997). Realizaram-se as análises de variância para as dosagens encontradas, utilizando o delineamento inteiramente casualizado. Em decorrência de significância entre os isolados, procedeu-se o estudo de comparação de médias pelo teste de Tukey a 5% de significância.

3.6 Eletroforese de proteínas

Os géis foram confeccionados em cubas de eletroforese (Pharmacia-Hoefer SE-600). O gel de separação foi a 12,5%, contendo 12,5 mL de solução estoque de acrilamida (30%); 7,5 mL de Tris-HCl 1,5 M pH 8,3; 0,3 mL de SDS 10%; 9,6 mL de H₂O destilada; 150 µL de persulfato de amônio (10% p/v) e 10 µL de TEMED. O gel de concentração foi a 5%, contendo 0,67 mL de solução estoque de acrilamida (30%); 1,25 mL de Tris-HCl 0,5 M pH 6,8; 50 µL de SDS 10%; 3 mL de H₂O destilada; 25 µL de persulfato de amônio (10% p/v) e 2,5 µL de TEMED. O sistema tampão gel/eletrodo utilizado foi Tris glicina e SDS. A quantidade aplicada de cada amostra variou de acordo com o cálculo de regressão da curva de BSA padrão, que possibilitou calcular a concentração de proteína presente em cada amostra. Utilizaram-se 4 repetições para cada amostra. A corrida foi desenvolvida a 10 mA para cada gel, num período de 5 horas e trinta minutos.

Após a migração, os géis foram corados em solução de Nitrato de Prata (Tabela 8).

TABELA 8 - Coloração dos géis de proteína em solução de Nitrato de Prata, segundo Blum, Beier e Gross (1987).

Fixação	Etanol	50% (v/v)	1 Hora
	Ácido acético	12% (v/v)	
	Formaldeído	37% (p/v) – 0.5mL/l.	
Lavagens	Etanol	50% (v/v)	3 de 20 minutos
Pré-tratamento	Tiosulfato de Sódio	0.2 g/L	1 minuto
Lavagens	H ₂ O ultra pura		3 de 20 Segundos
Incubação	Nitrato de Prata	0.2 g/L	20 minutos
Lavagens	H ₂ O ultra pura		2 de 20 Segundos
Revelação	Carbonato de sódio	60 g/L	até o aparecimento das bandas
	Formaldeído	37% (p/v) – 0.5 mL/L	
	Tiosulfato de sódio	4 mg/L	
Lavagens	H ₂ O ultra pura		2 de 20 Segundos
Lavagens	Etanol	50%	10 minutos
	Ácido acético	12%	
Fixação	Etanol	50%	

Na avaliação dos géis, cada banda foi considerada como um único caráter, e isto possibilitou a construção de uma matriz de zero a um. Para estimar a similaridade entre os isolados, utilizou-se o programa NTSYS 1.8 (Slice, Kim e Walker, 1994).

As estimativas de similaridade genética foram designadas por (sgij) entre cada par de população, e o coeficiente de similaridade de Jaccard, através da expressão $sgij = a / a + b + c$. As variáveis da expressão foram obtidas conforme demonstrado no seguinte esquema:

		População i	
		1	0
População j	1	A (1.1)	b (0.1)
	0	C (1.0)	d (0.0)

As similaridades foram transformadas para medidas de distâncias genéticas pela seguinte expressão: $dg_{ij} = 1 - sg_{ij}$. A partir da similaridade obtida por Jaccard, construiu-se a matriz de dissimilaridade, subtraindo-se a distância genética de 1.

A representação simplificada das distâncias genéticas foi feita por dendrogramas obtidos pelo método hierárquico aglomerativo da média aritmética entre pares não ponderados (Rohlf, 1992); para estes dados foi utilizado o programa STATISTICA 5.0 (Slice, Kim e Walker, 1994). Estas distâncias genéticas possibilitaram agrupar os isolados de *Pisolithus* spp. com padrões protéicos semelhantes.

3.7 Caracterização isoenzimática

Aos 28 dias de cultivo em meio MMN (Marx, 1969), o micélio de cada isolado foi coletado, pesado e armazenado em nitrogênio líquido por alguns minutos. Para cada 100 mg de micélio fresco, adicionaram-se 200 μ L de solução extratora (Tabela 9). Durante a maceração, pequenas quantidades de polivinilpirrolidona (PVPP) foram adicionadas para remover compostos fenólicos e aumentar a estabilidade das enzimas. O macerado foi obtido através da maceração manual em almofariz de porcelana previamente resfriado e mantido sobre placa de gelo. Após a maceração, centrifugaram-se as amostras a 13.000 rpm por 15 minutos a 4°C. Em seguida, procedeu-se a migração das enzimas.

TABELA 9 – Solução de extração de enzimas para micélio fúngico, segundo Alfenas et al. (1998).

Componentes	Quantidade
Tris - HCl pH 8.0 (0.2M)	2.42 g
PVP - 40	2.56 g
EDTA (1mM)	0.038 g
Polietilenoglicol (0.4%)	0.4 g
Água deionizada	100 mL
Total	100 mL

3.8 Eletroforese de isoenzimas

Os géis foram confeccionados em cubas de eletroforese (Pharmacia-Hoefer SE-600). O gel de separação foi a 12,5%, contendo 19 mL de solução estoque de acrilamida (30%); 11,5 mL de Tris-HCl 1,5 M pH 8.9; 15 mL de H₂O destilada; 150 µL de persulfato de amônio (10% p/v) e 10 µL de TEMED. O gel de concentração foi a 4%, contendo 2,68 mL de solução estoque de acrilamida (30%); 5 mL de Tris-HCl 0.5 M pH 6,8; 12 mL de H₂O destilada; 80 µL de persulfato de amônio (10% p/v) e 20 µL de TEMED. O sistema tampão gel/eletrodo utilizado foi Tris glicina. Para cada amostra foi aplicada uma alíquota de 30 µL em cada canaleta do gel concentrador e utilizaram-se 4 repetições para cada amostra. A migração foi desenvolvida a 10 mA e a 4°C para cada gel, totalizando 5 horas e trinta minutos

As atividades enzimáticas dos sistemas fosfatase ácida (ACP – EC 3.1.3.2) e β - esterase (EST – EC 3.1.1.1), foram reveladas de acordo com a metodologia descrita por Alfenas et al., 1998. As Tabelas 10 e 11 mostram as soluções usadas para a obtenção das atividades específicas das enzimas ACP e

EST em gel de poliacrilamida. Durante a revelação da atividade, os géis foram incubados a 37°C até o aparecimento das bandas. Após a detecção das bandas, os géis foram fixados em glicerol 10% e colocados em solução secante [metanol (65%) e glicerol (0.5%)]; a secagem foi feita pelo “método do bastidor”, descrito por Alfenas et al. (1991).

TABELA 10 – Solução utilizada na identificação específica da enzima fosfatase ácida (ACP), segundo (Alfenas, 1998).

Componentes	Quantidade
Tampão acetato 50 mM, pH 5.5	50 mL
β -naftilfosfato ácido de sódio 1% em acetona 50%	1.5 mL
MgCl ₂ 1M	0.5 mL
Fast Black K sal	50 mg
Total	52 mL

TABELA 11 – Solução utilizada na identificação específica da enzima esterase (EST) (Alfenas, 1998).

Soluções	Quantidade
Tampão tris 0,5M, pH 7.1	5 mL
β -naftilacetato 1% em acetona 50%	1.5 mL
Fast Blue RR sal	50 mg
Água destilada	50 mL
Total	52 mL

As avaliações dos géis foram feitas de forma idêntica às avaliações dos géis de proteína, como descrito no item 3.6.2.

3.9 Marcador Molecular - RAPD

Para a extração de DNA empregaram-se culturas com 28 dias de cultivo em meio MMN (Marx, 1969) de 5 isolados (P1, P2, P3, P4 e P37), escolhidos de acordo com sua colonização ao hospedeiro. O DNA foi extraído de acordo com a técnica descrita Schäfer e Wöstemeyer (1992) e modificado por Junghans et al. (1998).

O micélio de cada isolado foi coletado e pesado e a extração de DNA foi feita com 0,1g de micélio, com nitrogênio líquido e hastes plásticas diretamente em eppendorf®. Para cada amostra foram adicionados 600µL do tampão de extração (Tris 100 mM pH 8,0; NaCl 1,4 M; EDTA 20 mM pH 8,0, CTAB 2%, β-mercaptoetanol 2%). Os eppendorf®'s foram mantidos a 65°C por 60 minutos em banho-maria, sendo agitados a cada 10 minutos. Ao término da incubação, foi feita uma centrifugação a 13.000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi transferido para novo eppendorf®, adicionando-se o mesmo volume de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1), e a seguir fez-se a homogeneização do mesmo por 5 minutos. Após a homogeneização, uma nova centrifugação foi realizada nas mesmas condições e a fase superior foi transferida para um novo eppendorf®, adicionaram-se 2/3 do seu volume de isopropanol. Os eppendorf®'s foram mantidos a -20°C por 12 horas, e em seguida foram centrifugados a 13.000 rpm por 30 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi lavado três vezes com etanol 70% gelado; em seguida, secos em capela de fluxo laminar. Posteriormente, foi feita a ressuspensão em 100 µL de TE (1,0 mM Tris-HCl, 0,1 mM EDTA). A quantificação da concentração de DNA das amostras foi determinada através de um fluorímetro (HOEFER-TKO 100). Utilizaram-se, para cada amostra, 2 µL de DNA e 2 mL de tampão TNE 10x (1,3% Tris base; 0,37% Na₂EDTA.2H₂O; 11,68% NaCl pH 7,4).

A amplificação de seqüências do DNA via PCR foi conduzida em um volume de 12 µl, contendo 0,75 unidades de *Taq* DNA polimerase; 1,2 µl de tampão de reação concentrado (1M Tris, 1M MgCl₂, 250 µg/mLBSA, 1M KCL) ; 200 µM de cada dATP, dGTP, dTTP e dCTP; 2,3 mM de MgCl₂; 0,4 µM de primer e 20 ng do DNA genômico de cada cultura. Foram testados vários primers, e utilizados aqueles que apresentaram polimorfismo. O controle do DNA, para verificar contaminação, foi determinado pela omissão do DNA genômico em algumas reações. As amostras foram submetidas a um total de 45 ciclos de 1 min, com temperatura de denaturação de 94°C por 15 segundos, temperatura de alongação de 36°C por 30 segundos e temperatura de renaturação de 72°C por 1 minuto. Foi acrescido a estes ciclos um ciclo final de manutenção de 72°C por 5 minutos. As amplificações foram feitas em termociclador 9600 (Perkin-Elmer) e, após finalizadas, 3 µl de tampão de carregamento (0,25% azul de bromofenol, 60% glicerol) foram acondicionados em cada tubo e amostras de 10 µl foram depositadas em gel de agarose 1,5%. A eletroforese foi realizada a 7,5 V/cm durante aproximadamente 2 horas em tampão TBE. Após a migração, os géis foram corados com brometo de etídio e fotografados sob luz ultravioleta com câmara Polaroid.

Os dados moleculares foram analisados como descrito no item 3.6.2.

Após os 28 dias de cultivo, 5 isolados (P1, P2, P3, P4 e P37) foram selecionados para análises de suas variabilidades detectadas pelos marcadores morfológicos, protéicos (PAGE e SDS-PAGE) e molecular (RAPD). O marcador molecular RAPD foi considerado padrão para esta comparação por não ter influência ambiental.

As análises para cada marcador foram feitas como descritas anteriormente.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Crescimento micelial

Os resultados do crescimento micelial aos 7 dias de cultivo em meio MMN encontram-se na Figura 2. O isolado P36 foi o que apresentou o maior crescimento médio, de 11,75 mm. Este valor correspondeu a uma taxa de crescimento de 1,67 mm / dia. Aos 7 dias de cultivo, os isolados P8, P15, P16, P23, P29 e P30 não haviam crescido.

Aos 7 dias de cultivo, observou-se que alguns isolados cresceram mais que outros, isto pode ser devido ao fato de que nos primeiros dias houve influência dos fatores externos (temperatura, fotoperíodo, umidade e etc.) no crescimento dos isolados. Possivelmente estes estavam se adaptando às novas condições do meio. Resultados semelhantes foram obtidos por Battista et al. (1996), que aos 7 dias de cultivo em meio MMN, detectaram diferenças no crescimento micelial de diferentes isolados de *Laccaria bicolor*.

Os dados da análise de variância são apresentados na Tabela 12. O crescimento micelial dos isolados foi significativo aos 7 dias de cultivo.

As estimativas dos parâmetros genéticos demonstraram que 14,60% da variação detectada no crescimento médio dos isolados de *Pisolithus* spp. foram devidos a fatores genéticos e que 1,87% foram devidos a fatores ambientais (Tabela 13). Aos 7 dias de cultivo, observou-se uma herdabilidade de 88,63% para o crescimento micelial.

Embora aos 7 dias de cultivo em meio MMN o crescimento médio tenha sido baixo, foi detectada uma alta herdabilidade para esta característica. Este fato elucida a importância de utilização desta característica em programas de melhoramento de fungos ectomicorrízicos.

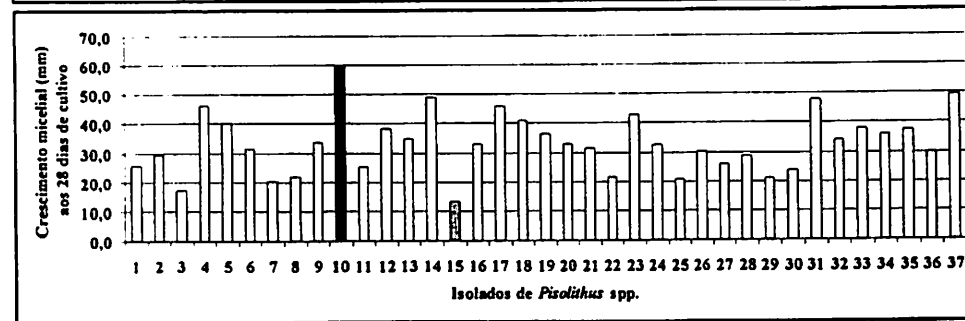
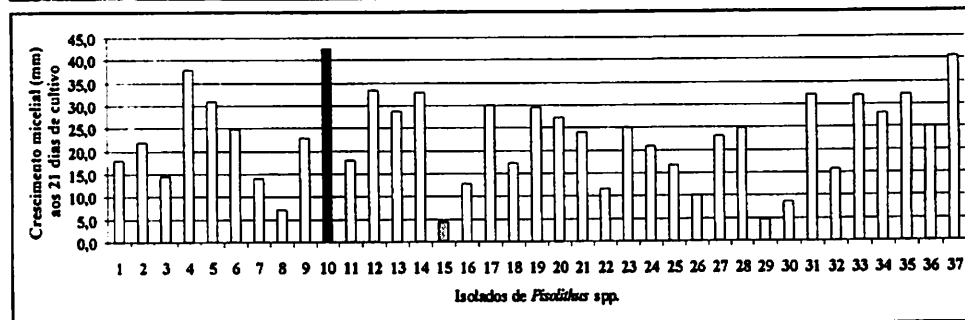
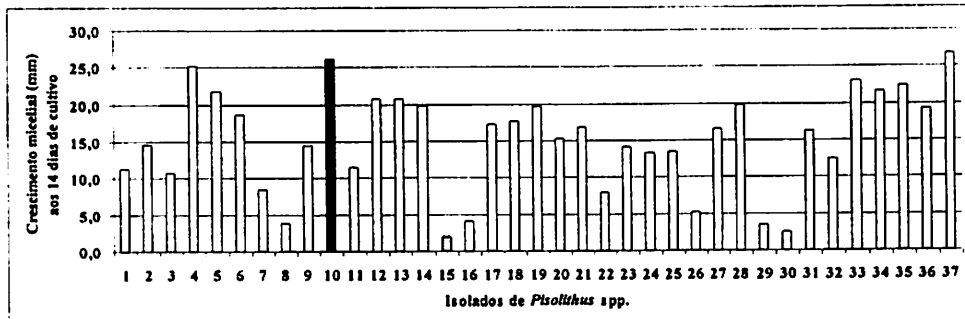
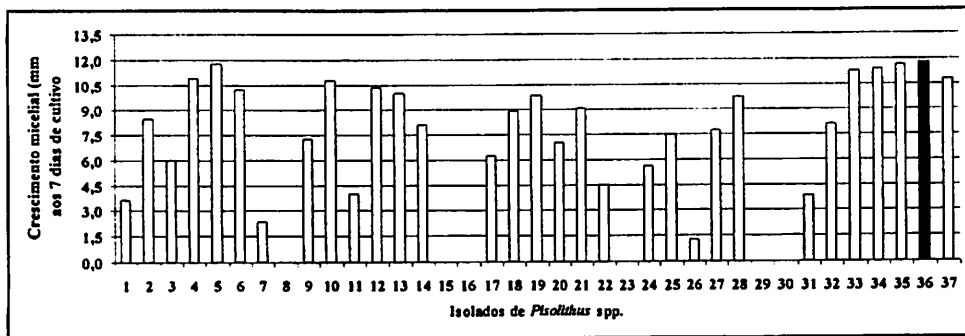


FIGURA 2 – Crescimento micelial de *Pisolithus* spp. aos 7, 14, 21 e 28 dias de cultivo em meio MMN.

TABELA 12 - Análise de variância para referente ao crescimento micelial de *Pisolithus* spp. aos 7, 14, 21 e 28 dias de cultivo em meio MNM.

Dias de cultivo	FV	GL	SQ	QM	F
7	Isolados	36	23,721153	6,58921	8,797**
	Resíduo	111	8,3142	0,74903	
14	Isolados	36	68,316558	1,897682	7,933**
	Resíduo	111	26,5513	0,239201	
21	Isolados	36	139,39068	3,874963	5,954**
	Resíduo	111	72,1788	0,650259	
28	Isolados	36	151,795642	4,216546	12,244**
	Resíduo	111	38,2257	0,344376	

TABELA 13 - Parâmetros genéticos estimados referente ao crescimento micelial de *Pisolithus* spp.

Dias de cultivo	Coefficiente de variação genética (%)	Coefficiente de variação ambiental (%)	Herdabilidade (%)
7	14,60	1,87	88,63
14	41,46	5,98	87,39
21	80,54	16,25	83,20
28	96,80	8,6	91,83

Aos 14 dias de cultivo em meio MMN, o isolado P10 apresentou um crescimento médio de 26,12 mm, correspondendo a uma taxa de 1,866 mm / dia. O isolado P15 foi o que apresentou o menor crescimento médio, 2,0 mm, correspondendo a uma taxa de 0,14 mm / dia (Figura 2).

Neste período, os isolados que aos 7 dias não haviam crescido (P8, P15, P16, P23, P29 e P30) já apresentaram crescimento em condições de cultivo. Observou-se um aumento no crescimento médio observado para todos os isolados, e este foi aproximadamente 80% superior em relação à avaliação anterior. Isto pode ser devido à ação de certas enzimas e hormônios responsáveis pelo crescimento, que neste período passam a ser mais ativos.

Os resultados da análise de variância são apresentados na Tabela 12. O crescimento micelial dos isolados foi significativo aos 14 dias de cultivo.

A alta significância encontrada no crescimento médio dos isolados de *Pisolithus* spp. possibilitou compreender a capacidade de determinados genótipos colonizarem diferentes plantas hospedeiras e explorarem diferentes tipos de solo. Resultados semelhantes também foram obtidos por Colpaert, Van Assche e Juijens (1992), Lamhamed, Bernier e Fortin (1992), Thomson, Grove e Malajczuk (1994), Ek (1997), Timonem, Tammi e Sem (1997).

As estimativas dos parâmetros genéticos são apresentadas na Tabela 13 e demonstraram que aos 14 dias de cultivo, 41,46% da variação encontrada entre os isolados foram devidos a fatores genéticos e 5,98% foram devidos a fatores ambientais. A herdabilidade para o crescimento micelial aos 14 dias de cultivo foi de 87,39%.

Aos 21 dias de cultivo em meio MMN, também o isolado P10 apresentou o maior crescimento médio, 42,5 mm, correspondendo a uma taxa de 2,02 mm / dia. O isolado P15 apresentou um menor crescimento médio, 4,375 mm, correspondendo uma taxa de 0,2mm / dia (Figura 2).

Um aumento significativo no crescimento médio foi observado aos 21 dias de cultivo, sendo igual ou superior a 60% em relação à avaliação anterior. Observaram-se também diferenças no crescimento médio dos isolados estudados, o que permitiu agrupar os isolados por classes de crescimento. Burgess et al. (1995) também obtiveram resultados semelhantes, sendo que aos 21 dias de cultivo em meio MMN, classificaram os 100 isolados de *Pisolithus* sp. estudados em três classes distintas; baixa (< 1,5 mm/dia), média (1,5 a 3,0 mm/dia) e alta (> 3,0 mm/dia).

Os resultados da análise de variância são apresentados na Tabela 12. O crescimento micelial dos isolados foi significativo aos 21 dias.

As estimativas dos parâmetros genéticos são apresentados na Tabela 13. Estes demonstraram que 80,54% da variação do crescimento micelial existente entre os isolados são devidos a fatores genéticos e 16,25% são devidos a fatores do ambientais. A herdabilidade para o crescimento micelial foi de 83,20% aos 21 dias de cultivo em meio MMN.

Aos 21 dias de cultivo em meio MMN o percentual de variação genética foi 100% maior que aquele observado aos 14 dias, o que indica maior variabilidade genética quando as culturas encontram-se em idades mais avançadas.

Aos 28 dias de cultivo em meio MMN, o isolado P10 apresentou o maior crescimento médio, 60,125 mm, correspondendo uma taxa de 2,147 mm / dia. O isolado P15 também continuou apresentando um menor crescimento, de 13,25 mm, correspondendo uma taxa de 0,47 mm / dia (Figura 2).

Todos os isolados apresentaram um maior crescimento médio aos 28 dias de cultivo. Para todos os isolados observou-se um aumento no crescimento em torno de 60% em relação aos 21 dias. Os resultados obtidos possibilitaram separar os isolados em 2 classes de crescimento; baixa (< 1,5 mm / dia) e alta (> 1,5 mm / dia). Dos 37 isolados de *Pisolithus* spp., 30 foram classificados como

isolados de baixo crescimento, o que correspondeu a 81% dos isolados e 7 foram classificados como isolados de alto crescimento (P4, P10, P14, P17, P24, P31 e P37). Outro fato importante a ser considerado é que todos os isolados de classe alta apresentaram textura aveludada, densidade de média a alta e peso também de médio a alto. Os resultados demonstraram que a taxa de crescimento em meio de cultura pode ser diretamente influenciada pela textura, densidade e peso.

Os resultados da análise de variância para o crescimento micelial dos isolados de *Pisolithus* spp., aos 28 dias de cultivo, são apresentados na Tabela 12. O crescimento micelial dos isolados foi significativo aos 28 dias de cultivo.

Os cálculos dos parâmetros genéticos são apresentados na Tabela 13. Estes demonstraram que 96,80% da variação para o crescimento micelial detectada entre os isolados de *Pisolithus* spp. foram devidos a fatores genéticos e que 8,6% foram devidos a fatores ambientais. A herdabilidade para o crescimento micelial, aos 28 dias de cultivo, foi de 91,83%.

As médias do crescimento micelial de todos os isolados estudados nas 4 épocas de avaliação (7, 14, 21 e 28 dias de cultivos) são apresentadas no Anexo 1A.

Os resultados obtidos demonstraram uma grande variabilidade no crescimento micelial de *Pisolithus* spp. Esta diferença de crescimento micelial pode ser devida a vários fatores, sendo a procedência geográfica dos isolados um fator de grande influência. Burgess et al. (1995), estudando diferentes isolados de *Pisolithus* nativos da Austrália, detectaram variação na taxa de crescimento *in vitro* e constataram que o alto crescimento estava relacionado com a procedência geográfica dos isolados e também com a especificidade do simbionte ao hospedeiro.

Como os maiores crescimentos médios ocorreram entre o 21º e o 28º dia de cultivo em meio MMN, e também as maiores herdabilidades, todas as

análises das características morfológicas (textura, cor, forma), protéicas, isoenzimáticas e moleculares foram realizadas aos 28 dias de cultivo.

Segundo Alfenas (1998), a determinação da curva de crescimento é de grande importância para determinar a fase exponencial do crescimento do fungo. Isto porque, nesta fase, a ação de enzimas proteolíticas é reduzida, o que favorece a expressão de determinados genes.

O crescimento é uma característica importante na seleção de isolados, pois espera-se que isolados de maior crescimento em meio de cultura possam também apresentar maior crescimento no substrato utilizado na produção de mudas, o que possibilita uma colonização mais efetiva da planta hospedeira.

4.2 Caracterização morfológica

As análises morfológicas dos isolados de *Pisolithus* spp. foram efetuadas após 4 semanas de cultivo em meio MMN. Os isolados de *Pisolithus* spp. apresentaram diferenças com relação às características morfológicas analisadas. Os resultados são apresentados na Tabela 14. O número de isolados para as 11 características morfológicas avaliadas e sua respectiva porcentagem estão na Tabela 15.

TABELA 15 – Número e porcentual isolados de *Pisolithus* spp. para as características morfológicas analisadas.

Características	Número de isolados	Percentual (%)
Textura: aveludada	17	46
Floculenta	9	24
Flutuante	10	27
Áspera	1	3
Formação de cordão: Presente	21	56
Ausente	16	44
Cor do ágar: não colorido	18	49
Ligeiramente colorido	19	51
Formação de halo: presente	13	35
Ausente	24	65
Forma da colônia inferior: grudada	37	100
Forma da colônia superior: aérea	37	100
Margem da colônia: regular	25	68
Irregular	12	32
Cor da colônia: creme	1	3
Amarelo	7	19
Amarelo escuro	12	32
Ocre	7	19
Marrom	10	27
Peso: < 3 mg/dia	4	11
3 – 6 mg/dia	19	51
> 6 mg/dia	14	38
Crescimento: < 1.5 mm/dia	30	81
> 1.5 mm/dia	7	19
Densidade: < 3 mg/mm	3	8
3 – 6 mg/mm	27	73
> 6 mg/mm	7	19

As características textura, cor de colônia, peso, crescimento e densidade foram as que apresentaram as maiores variações. As características forma de colônia inferior e forma de colônia superior não apresentaram variações entre os isolados. Dados semelhantes foram obtidos por Burgess et al. (1995), que estudando isolados de *Pisolithus*, também encontraram variação quanto às características dos isolados, morfologia dos basidiosporos e forma do basidiocarpo. Toda esta variabilidade existente entre os isolados de *Pisolithus* permite classificar e caracterizar os isolados tanto por especificidade de hospedeiro como por procedência geográfica. Estas informações coincidem com os resultados obtidos por Watling et al. (1995) e Burgess et al. (1995).

TABELA 14 – Caracterização Morfológica de diferentes isolados de *Pisolithus* sp.

Isolados	Textura	Cordão	Cor do Ágar	Halo	FCI	FCS	Margem da colônia	Cor da colônia	Peso mg/dia	Cresc mm/dia	Densidade mg/mm
P1	Av	A	NC	A	G	Ae	R	AE	3-6	<1.5	>6
P2	Fl	A	NC	A	G	Ae	R	A	3-6	<1.5	3-6
P3	Fl	A	NC	A	G	Ae	R	C	3-6	<1.5	3-6
P4	Av	A	LG	P	G	Ae	I	M	>6	>1.5	3-6
P5	Av	A	LG	P	G	Ae	R	O	3-6	<1.5	<3
P6	Av	A	LG	P	G	Ae	I	M	>6	<1.5	>6
P7	Fl	P	NC	A	G	Ae	R	AE	<3	<1.5	3-6
P8	Fl	A	NC	A	G	Ae	R	A	<3	<1.5	3-6
P9	Flu	A	NC	A	G	Ae	I	A	3-6	<1.5	3-6
P10	Av	P	LG	A	G	Ae	R	O	3-6	>1.5	3-6
P11	Av	P	LG	A	G	Ae	R	O	3-6	<1.5	3-6
P12	Av	A	LG	P	G	Ae	R	M	>6	<1.5	3-6
P13	Av	P	LG	P	G	Ae	R	M	>6	<1.5	3-6
P14	Av	P	LG	P	G	Ae	R	M	<3	>1.5	3-6
P15	Fl	A	NC	A	G	Ae	R	A	3-6	<1.5	3-6
P16	Av	A	LG	A	G	Ae	R	O	3-6	<1.5	3-6
P17	Av	P	LG	A	G	Ae	R	O	>6	>1.5	>6
P18	Av	P	LG	P	G	Ae	I	M	3-6	<1.5	3-6
P19	Av	P	LG	P	G	Ae	I	M	3-6	<1.5	3-6
P20	Flu	A	NC	P	G	Ae	R	AE	<3	<1.5	<3
P21	Fl	A	NC	A	G	Ae	R	A	3-6	<1.5	3-6
P22	Fl	A	NC	A	G	Ae	R	A	>6	<1.5	3-6
P23	Av	P	LG	A	G	Ae	R	O	>6	<1.5	3-6
P24	Av	P	LG	A	G	Ae	R	AE	3-6	>1.5	>6

“...continua...”

“TABELA 14, Cont”

P25	Flu	A	NC	A	G	Ae	R	AE	>6	<1.5	>6
P26	F1	A	NC	A	G	Ae	R	A	3-6	<1.5	3-6
P27	Flu	A	NC	A	G	Ae	R	AE	3-6	<1.5	3-6
P28	Flu	P	NC	A	G	Ae	R	AE	3-6	<1.5	3-6
P29	Flu	P	NC	A	G	Ae	I	AE	3-6	<1.5	3-6
P30	Av	P	LG	A	G	Ae	R	O	3-6	<1.5	3-6
P31	As	P	LG	A	G	Ae	I	AE	>6	>1.5	>6
P32	Flu	P	NC	A	G	Ae	I	AE	>6	<1.5	3-6
P33	Flu	P	LC	P	G	Ae	I	M	>6	<1.5	3-6
P34	Flu	P	LC	P	G	Ae	I	M	>6	<1.5	3-6
P35	Flu	P	LC	P	G	Ae	I	M	>6	<1.5	3-6
P36	Flu	P	NC	P	G	Ae	I	AE	>6	<1.5	>6
P37	Av	P	NC	A	G	Ae	R	AE	3-6	>1.5	3-6

Características morfológicas avaliadas: Textura - Aveludada (Av), floculenta (Fl), fluante (Flu), áspera (As); Cordão - ausente(A) ou presente (P); Cor do Ágar - Não Colorido (NC) ou Ligeiramente Colorido (LC); Halo - ausente (A) ou presente (P); Forma da colônia inferior - grudada(G); Forma da colônia superior - aérea (Ae); Margem da colônia - regular (R) ou irregular (I); Cor da Colônia - Amarelo escuro (AE), Amarelo (Am), Creme (C), Marrom (M), Ocre (O); Peso - <3mg/dia, 3-6mg/dia, >6mg/dia; Crescimento - <1.5mm/dia, >1.5mm/dia; Densidade - <3mg/mm, 3-6mg/mm, >6mg/mm;

As diferenças morfológicas, como crescimento, textura, cor da colônia e margem da colônia, são apresentadas na Figura 3.

Após efetuados os cruzamentos dos isolados, foram encontradas diferenças nas suas descendências. Os isolados P5 (H6) e P36 (I1), quando cruzados, formaram o “híbrido” P31 [H6 x I1(ZI)], que apresentou características dos genitores, principalmente cor e crescimento, e pode ser observado na Figura 4a.

Resultados semelhantes foram também obtidos para outros híbridos de vários cruzamentos, por exemplo o híbrido P30 [H6 x 441 (ZI)], que apresentou a coloração e textura dos genitores (Figura 4b).

As análises das características morfológicas dos 37 isolados de *Pisolithus* spp. estudados possibilitaram a construção de uma matriz de dissimilaridade (Anexo 1B). O dendrograma obtido pelo método UPGMA pode ser observado na Figura 5. Pela análise das características morfológicas, foi possível agrupar os isolados de *Pisolithus* spp. que apresentaram características semelhantes.

Analisando o dendrograma formado pelo agrupamento da caracterização morfológica, verificou-se que a 55% de similaridade, 3 grupos foram formados. O grupo 1, formado por 9 isolados: [P31 (H6 x I1 ZI), P24 (MA1 x 441 ZI), P17 (MB3 x H6 ZI), P10 (MB2 x H6 S4+), P23 (MA1 x H6 ZI), P30 (H6 x 441 ZI), P11 (MB3 x H6 S4-), P16 (MB2 x H6 ZI) e P5 (H6)]; o grupo 2, formado por 10 isolados: [P36 (I1), P18 (MB2 x 270 ZI), P6 (MA1 x 270 S3+), P35 (270 x I1 ZI), P34 (270 x 441 ZI), P33 (270 x H6 ZI), P19 (MB3 x 270 ZI), P13 (MB3 x 270 S4+), P12 (MB2 x 270 S4+) e P14 (MA1 x 270(ZI))]; e o grupo 3, formado por 17 isolados: [P26 (MB2 x 441 ZI), P21 (MA1 x MB3 ZI), P15 (MB2 x (MB2xMB3) ZI), P8 (MA1 x (MA1xMB3) S3+), P27 (MB2 x I1 ZI), P3 (MB3), P22 (MA1 x MB2 ZI), P2 (MB2), P32 (441 x I1 ZI), P29 (MB3 x I1 ZI), P9 (MB2 x (MB2xMB3) S4-), P37 (441), P28 (MB3 x 441 ZI), P7 (MA1 x

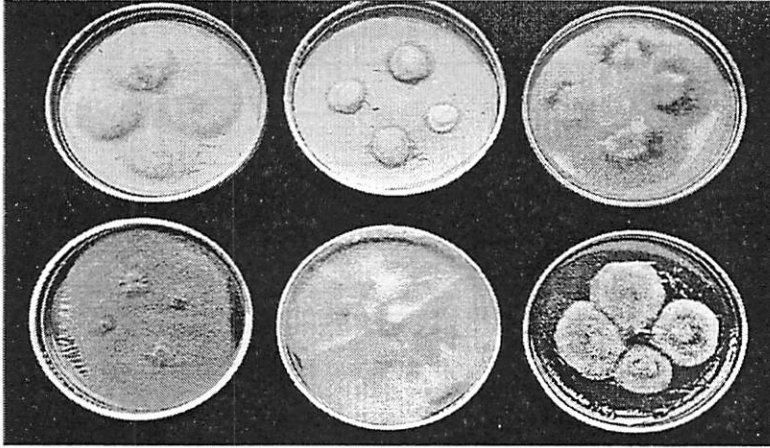


FIGURA 3 – Características morfológicas de isolados de *Pisolithus* spp.

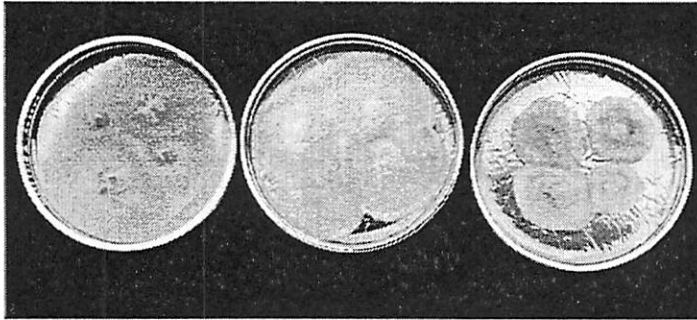


FIGURA 4a – Paternos e híbrido de *Pisolithus* spp.

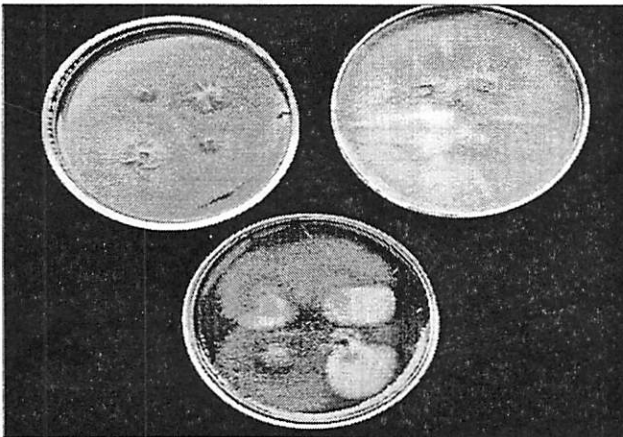


FIGURA 4b – Paternos e híbrido de *Pisolithus* spp.

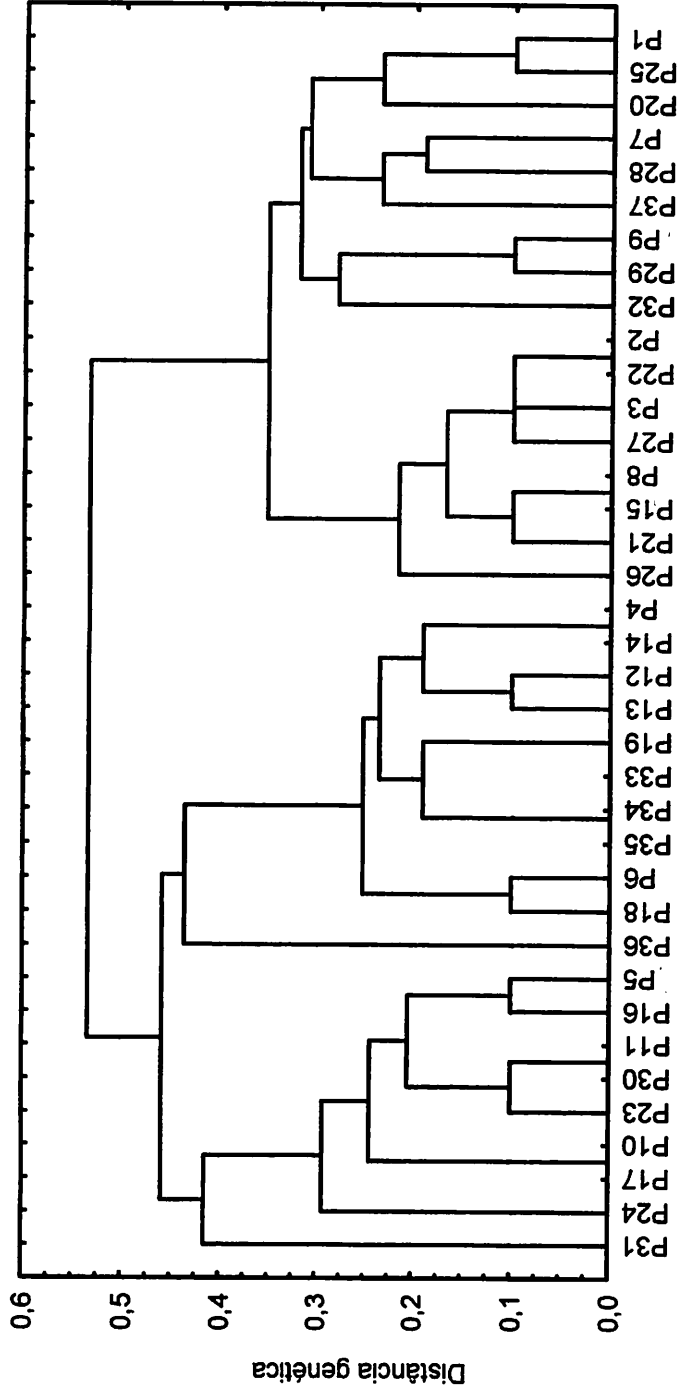


FIGURA 9 – Dendrograma obtido através da análise morfológica de isolados *Pisolithus* spp.

(MB2xMB3) ZI), P8 (MA1 x (MA1xMB3) S3+), P27 (MB2 x I1 ZI), P3 (MB3), P22 (MA1 x MB2 ZI), P2 (MB2), P32 (441 x I1 ZI), P29 (MB3 x I1 ZI), P9 (MB2 x (MB2xMB3) S4-), P37 (441), P28 (MB3 x 441 ZI), P7 (MA1 x (MB2xMB3) S4+), P20 (MB2 x MB3 ZI), P25 (MA1 x I1 ZI) e P1 (MA1). No grupo 1, verificou-se que os isolados P23, P30, P16 e P5 foram os mais próximos, com uma similaridade de 90%, e que o isolado P31 foi o mais divergente do grupo.

No do grupo 2, verificou-se que os isolados P18, P6, P13 e P12 foram os mais próximos, com similaridade de 90%, e que o isolado P36 foi o mais divergente do grupo.

No grupo 3, o que apresentou um maior número de isolados (45%), verificou-se que os isolados P21 (MA1 x MB3 ZI), P15 (MB2 x (MB2xMB3) ZI), P27 (MB2 x I1 ZI), P3 (MB3), P22 (MA1 x MB2 ZI), P29 (MB3 x I1 ZI), P9 (MB2 x (MB2xMB3) S4-), P25 (MA1 x I1 ZI) e P1 (MA1) foram os mais próximos, com similaridade de 90%, e o isolado P2 foi o mais divergente.

De acordo com as características morfológicas avaliadas, o isolado P4 foi o mais divergente; isto possivelmente se deve ao fato deste isolado ser colonizador de raízes de *Pinus* e ser de procedência americana.

A análise pelo método UPGMA permitiu, ainda, fazer uma distinção quanto à distribuição dos isolados genitores e seus híbridos para cada grupo formado. No grupo 1 predominaram o genitor P5 (H6), de procedência canadense, e seus respectivos híbridos (P10, P11, P16, P17, P23, P24, P30 e P31).

No grupo 2 predominaram o genitor P4 (270), de procedência americana, e seus respectivos híbridos (P6, P12, P13, P14, P18, P19, P33, P34 e P35).

No grupo 3 predominaram os genitores monocarióticos brasileiros (P1, P2 e P3) e seus respectivos híbridos, formados dos seus cruzamentos e de suas

interações (P7, P8, P9, P15, P20, P21, P22). Observou-se também, no grupo 3, que dos seis híbridos obtidos do genitor P37 (441), quatro encontraram-se neste grupo (P26, P28, P30 e P32).

Os resultados das análises morfológicas demonstraram que houve uma relação direta dos isolados com a espécie hospedeira. Observou-se que o isolado P4, que é colonizador de *Pinus*, foi o mais divergente (55%). Isto reforça os resultados obtidos por Ho (1987), com dados de variação fenotípica de *Laccaria*, Jacobson e Miller (1992), com *Suillus* e Lei et al. (1990) com *Pisolithus*. Todos estes autores demonstraram que a espécie de planta hospedeira e a procedência geográfica são fatores importantes no agrupamento de fungos ectomicorrízicos.

Resultados semelhantes foram encontrados por Burgess et al. (1995), que estudando 100 isolados de *Pisolithus*, sendo 85 nativos da Austrália e 15 não nativos, encontraram variação quanto às características das colônias, morfologia dos basidiosporos e forma do basidiocarpo. Com base nas suas características fenotípicas, sete grupos foram encontrados, com índice de similaridade de 50%. Variações marcantes foram detectadas quanto ao diâmetro, presença de espinhos e forma dos basidiosporos. Os basidiocarpos variaram quanto à forma e tamanho. Os autores observaram que estas variações estão diretamente relacionadas com a espécie hospedeira e a origem geográfica dos mesmos.

Todos os resultados demonstraram que quanto mais expressivas forem as diferenças na morfologia, maior será a sua influência na formação do agrupamento, o que confirma os resultados obtidos por Anderson, Chambers e Cairney (1998), que utilizaram características morfológicas para detectar a ocorrência de *Pisolithus* em uma área de reflorestamento.

Os resultados obtidos demonstraram que o fungo *Pisolithus* apresenta uma considerável variação morfológica, e isto pode ser utilizado para a caracterização de genótipos. Devido a esta grande diversidade, supõe-se que o

fungo *Pisolithus* já passou por um complexo processo evolutivo. Isto poderá ser comprovado pela resposta à colonização de determinados genótipos e também pela sua sobrevivência em ambientes adversos.

A distância média entre os isolados foi de 42% e a amplitude das distâncias variou de 0 a 82%. Estes resultados demonstraram que existem possibilidades de obtenção de ganho genético a partir destes cruzamentos controlados entre isolados de diferentes origens. A alta amplitude das distâncias possibilita a manipulação destes isolados em programas de melhoramento de simbiose, permitindo a seleção de genótipos que ampliam a base genética ser explorada. Os isolados P4 e P21, P4 e P25 apresentaram distâncias entre si superiores a 80% de divergência. Os isolados P4 e P14, P10 e P17, P33 e P34, P33 e P35, P34 e P35, pelas análises das características morfológicas, foram semelhantes (100%).

Utilizando a composição de agrupamento obtido pelo método UPGMA, foi construída uma matriz de divergência genética entre e dentro dos 3 grupos obtidos e também foram identificados quais os isolados promissores para maximização das distâncias entre os grupos (Tabela 23).

TABELA 16 – Matriz de distância genética (%) entre os grupos definidos na caracterização morfológica dos isolados de *Pisolithus* spp.

	G1	G2	G3
G1	73%* (P31/P5)		
G2	73% (P36/P6)	55%* (P12-P36)	
G3	73% (P22/P31)	73% (P2/P18)	37%* (P2/P29)

* na diagonal – maximização das distâncias dentro dos grupos
abaixo da diagonal: maximização das distâncias entre os grupos

As distâncias entre os grupos foram maiores do que dentro dos grupos (Tabela 16), isto indica que a diversidade poderá ser aumentada por cruzamentos realizados entre os grupos. Estes cruzamentos poderão ser formados pela utilização dos cruzamentos mostrados abaixo da diagonal (Tabela 16).

4.3 Caracterização protéica de isolados de *Pisolithus* spp.

4.3.1 Quantificação da concentração protéica

Os resultados da concentração de proteínas dos diferentes isolados de *Pisolithus* spp. podem ser observados na Figura 6.

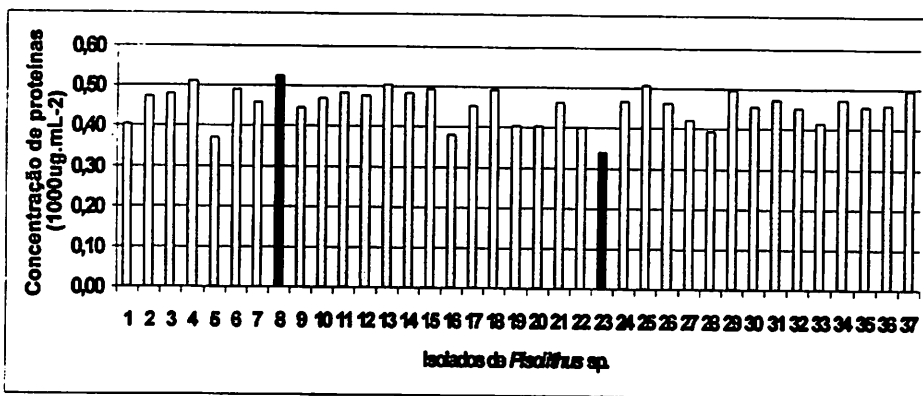


FIGURA 6 - Concentração de proteínas dos isolados de *Pisolithus* spp. aos 28 dias de cultivo em meio MMN.

Não houve diferença significativa na concentração de proteínas dos isolados e os resultados são apresentados na Tabela 17. Apesar de não ser estatisticamente significativo, o isolado P8 apresentou a maior concentração de

proteínas ($0,526 \times 1000 \mu\text{g.mL}^{-2}$) e o isolado P23 a menor ($0,340 \times 1000 \mu\text{g.mL}^{-2}$).

TABELA 17 - Análise de variância para a concentração de proteínas dos isolados de *Pisolithus* spp. aos 28 dias de cultivo em meio MMN.

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	36	0,166292	0,003786	1,3966
Resíduo	37	0,1003	0,002711	
Total	73	0,2366		

Os parâmetros genéticos para os dados da concentração de proteínas são apresentados na Tabela 18. As estimativas dos parâmetros genéticos mostraram que 0,053% da variação foi devido a fatores genéticos e que 0,135% foi devido a fatores ambientais.

TABELA 18 - Parâmetros genéticos estimados para a concentração de proteínas de isolados de *Pisolithus* spp. aos 28 dias de cultivo em meio MMN.

Varição Genética	Varição Ambiental	Herdabilidade
0,053%	0,135%	28,39%

A estimativa da herdabilidade foi baixa (28,39%), isto indica um baixo controle genético na expressão da característica, inviabilizando o seu uso em programas de melhoramento.

4.3.2 Caracterização dos isolados por eletroforese monodimensional (1D-SDS- PAGE)

Os perfis eletroforéticos dos isolados de *Pisolithus* spp. obtidos pela eletroforese em gel de poliacrilamida (1D- SDS-PAGE) e coloração em nitrato de prata podem ser visualizados na Figura 7.

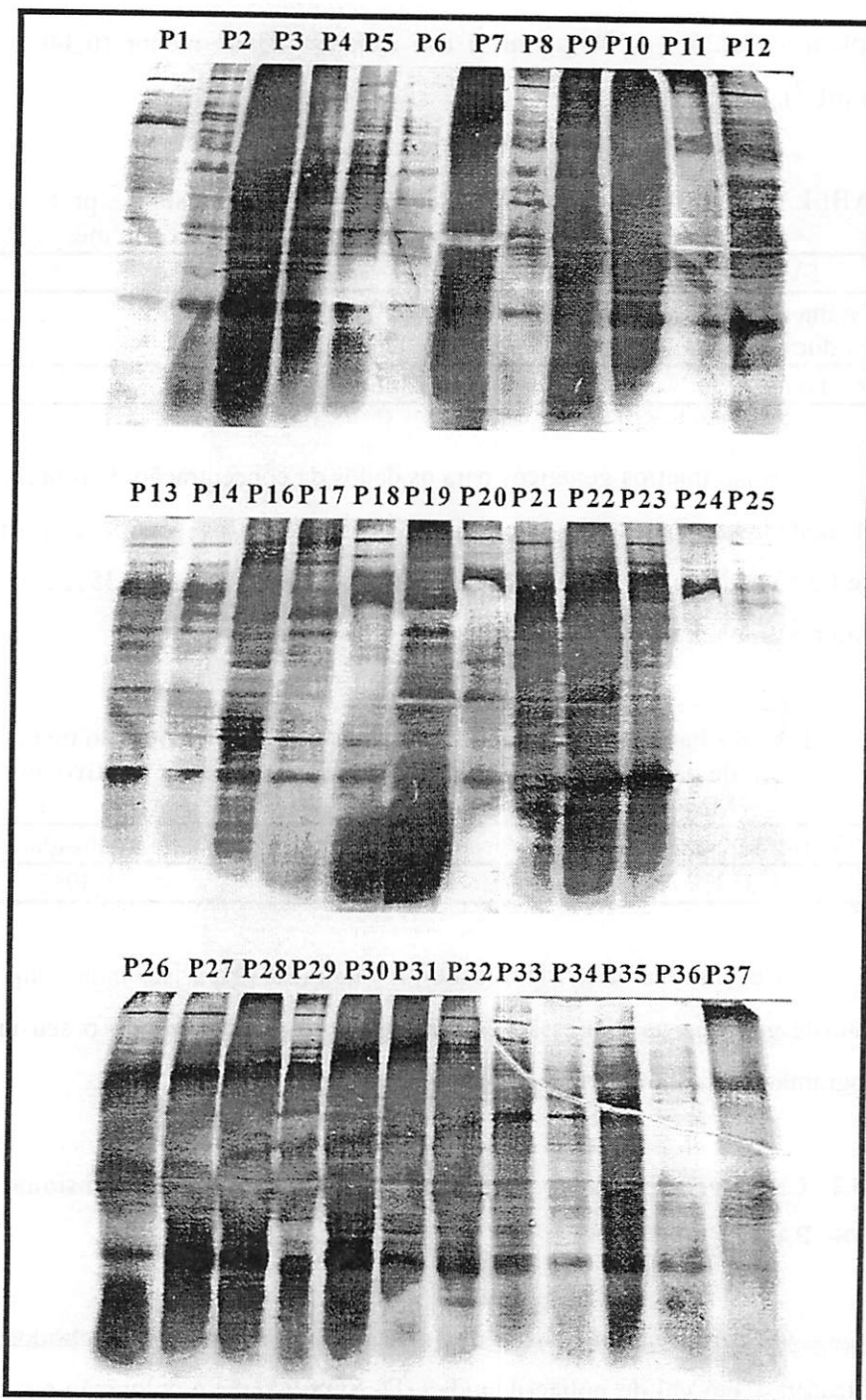


FIGURA 7 – Caracterização fenotípica dos perfis de polipetídeos de *Pisolithus* spp.

Foram identificadas 32 bandas polimórficas e 8 monomórficas. Um número semelhante de perfis protéicos em *Pisolithus* foi detectado por Burgess et al. (1995). Estes autores encontraram 30 bandas polimórficas em diferentes isolados de *Pisolithus*, utilizando o mesmo método de detecção de proteínas.

A análise binária dos perfis possibilitou a construção de uma matriz de dissimilaridade (Anexo 1C) e o dendrograma foi obtido utilizando o método de agrupamento UPGMA (Figura 8).

Analisando o dendrograma formado pelo agrupamento baseado em perfis de protéicos, verificou-se a formação de 4 grupos com similaridade de 55%. O grupo 1, formado por quatro isolados: [P32 (441 x I1 ZI), P29 (MB3 x I1 ZI), P27 (MB2 x I1 ZI) e P26 (MB2 x 441 ZI)]; o grupo 2, por sete isolados: [P37 (441), P36 (I1), P34 (270 x 441 ZI), P35 (270 x I1 ZI), P33 (270 x H6 ZI), P4 (270) e P3 (MB3)]; o grupo 3, formado por cinco isolados: [P31 (H6 x I1 ZI), P30 (H6 x 441 ZI), P28 (MB3 x 441 ZI), P10 (MB2 x H6 S4+) e P7 (MA1 x (MB2xMB3) S4+)]; e o grupo 4, formado por vinte isolados [P22 (MA1 x MB2 ZI), P16 (MB2 x H6 ZI), P19 (MB3 x 270 ZI), P18 (MB2 x 270 ZI), P23 (MA1 x H6 ZI), P21 (MA1 x MB3 ZI), P20 (MB2 x MB3 ZI), P17 (MB3 x H6 ZI), P15 (MB2 x (MB2xMB3) ZI), P14 (MA1 x 270 ZI), P25 (MA1 x I1 ZI), P24 (MA1 x 441 ZI), P11 (MB3 x H6 S4-), P9 (MB2 x (MB2xMB3) S4-), P8 (MA1 x (MA1xMB3) S3+), P12 (MB2 x 270 S4+), P2 (MB2), P6 (MA1 x 270 S3+), P5 (H6) e P1(MA1)]. No grupo 1, verificou-se que os isolados P27 e P26 foram os mais próximos, com similaridade de 82%, e que o isolado P32 foi o mais divergente do grupo, com similaridade de 59%.

No grupo 2, verificou-se que os isolados P33 e P35 foram os mais próximos, com similaridade de 84%, e que o isolado P37 foi o mais divergente do grupo. No grupo 3, verificou-se que os isolados P30 e P31 foram os mais próximos, com similaridade de 88%, e que os isolados P7 e P10 foram os mais divergentes.

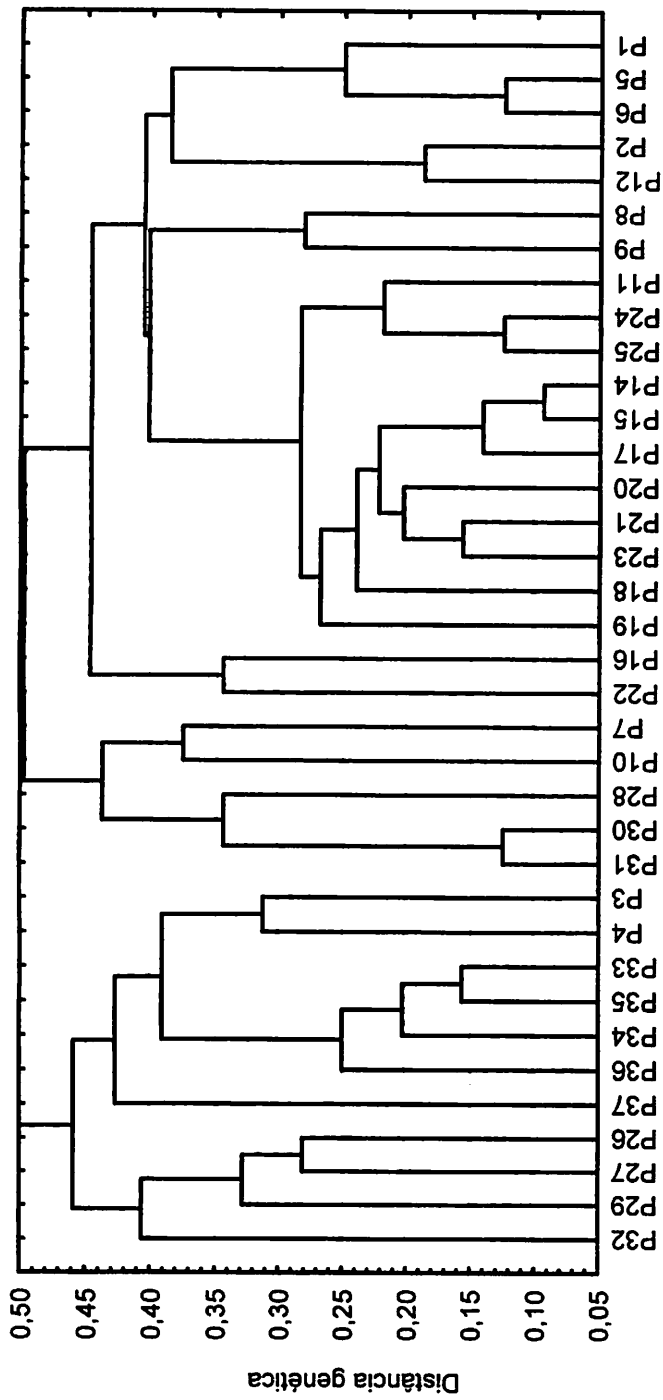


FIGURA 8 – Dendrograma obtido entre os isolados de *Pisolithus* spp. construídos com base na análise dos perfis proteicos.

O grupo 4 foi o que apresentou um maior número de isolados agrupados (54%); verificou-se que os isolados P14 e P15 foram os mais próximos, com similaridade de 91%. Os isolados P22 e P16 foram os mais divergentes.

O agrupamento obtido pela análise dos perfis de polipeptídeos não demonstrou relação com o agrupamento obtido por características morfológicas (Figura 5). Porém, observou-se que o agrupamento dos isolados baseado nos perfis protéicos foi mais discriminante que o agrupamento pelas análises das características morfológicas. Possivelmente, isto se deve ao fato de as características morfológicas estarem mais sujeitas à influência de fatores ambientais.

Estes resultados concordam com os obtidos por Burgess et al. (1995), segundo os quais os isolados de *Pisolithus* foram separados pela análise dos perfis protéicos em cinco grupos distintos, a uma similaridade de 60%.

A distância média entre os isolados foi de 54%, e a amplitude das distâncias variou de 9 a 80%. Estes resultados demonstraram que existem boas possibilidades de ganho genético ao se efetuarem cruzamentos entre os isolados de *Pisolithus* spp. pela caracterização protéica, pois a distância pode ser considerada alta. A alta amplitude das distâncias possibilita a utilização destes isolados em programas de melhoramento de simbiose, permitindo a seleção de genótipos que ampliam a base genética ser estudada. Os isolados P10 e P31, P13 e P29, P13 e P30, P18 e P29, P20 e P31 apresentaram distâncias entre si superiores a 70%. Os isolados de menor divergência foram P5 e P6, P13 e P16, P29 e P30, pelas análises de seus perfis protéicos, foram os mais semelhantes (90%).

Utilizando a composição de agrupamento obtido pelo método UPGMA, foi construída uma matriz de distância entre e dentro dos 4 grupos obtidos e também foram identificados quais os isolados promissores para maximização das distâncias entre os grupos (Tabela 19).

TABELA 19 – Matriz de distância genética (%) entre os grupos definidos na caracterização morfológica dos isolados de *Pisolithus* spp.

	G1	G2	G3	G4
G1	53%* (P27/P32)			
G2	56% (P27/P37)	55%* (P12-P36)		
G3	65% (P10/P26)	65% (P31/P37)	71% (P1/P10)	
G4	63% (P14/P32)	56% (P22/P35)	62% (P16/P30)	25% (P15/P22)

* na diagonal – maximização das distâncias dentro dos grupos
abaixo da diagonal: maximização das distâncias entre os grupos

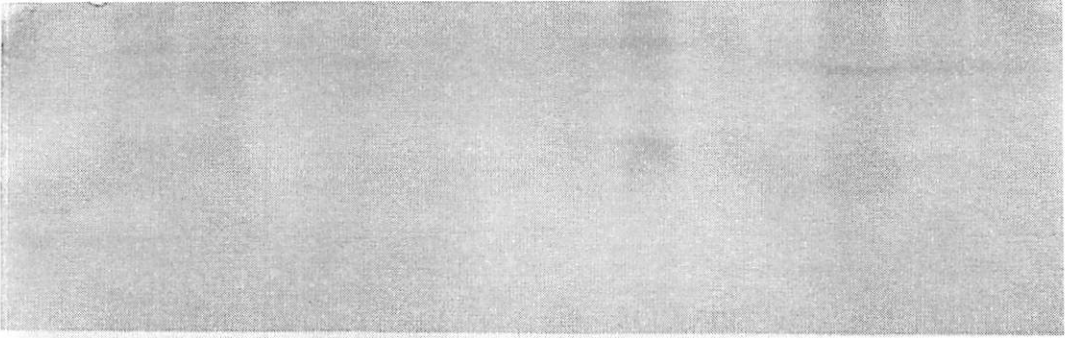
Para os grupos G1, G2 e G4, as distâncias entre os grupos foram maiores do que dentro dos grupos (Tabela 19), isto indica que a variabilidade genética poderá ser aumentada se forem efetuados cruzamentos entre os isolados destes grupos. Para o grupo G3, a distância dentro do grupo foi maior do que entre os grupos, o que indica que a variabilidade será aumentada se os cruzamentos dos isolados foram efetuados (Tabela 19)

4.4 Caracterização isoenzimática

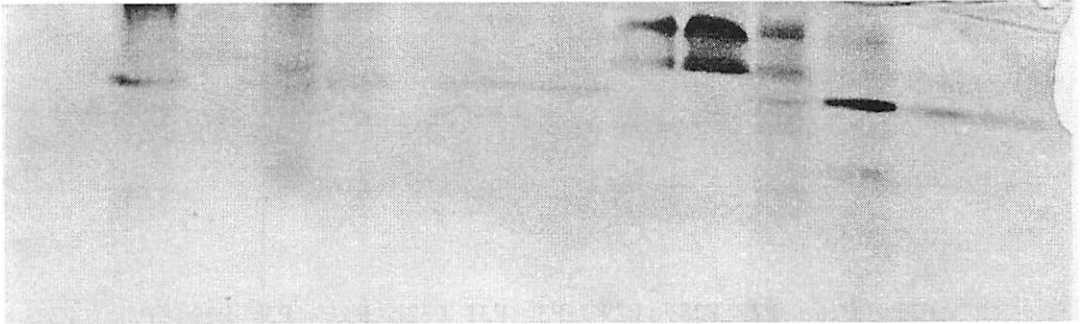
As análises dos perfis isoenzimáticos revelados para as enzimas ACP e EST mostraram diferenças entre os isolados de *Pisolithus* spp. estudados.

Os perfis isoenzimáticos dos diferentes isolados de *Pisolithus* spp., após eletroforese em gel de poliacrilamida, revelados para as enzimas ACP e EST, podem ser vistos nas Figuras 9 e 10. Os zimogramas obtidos para os dois sistemas enzimáticos utilizados são apresentados nas Figuras 11 e 12.

P1 P2 P3 P4 P5 P6 P7 P8 P9 P10 P11 P12 P13



P14 P15 P16 P17 P18 P19 P20 P21 P22 P23 P24 P25



P26 P27 P28 P29 P30 P31 P32 P33 P34 P35 P36 P37

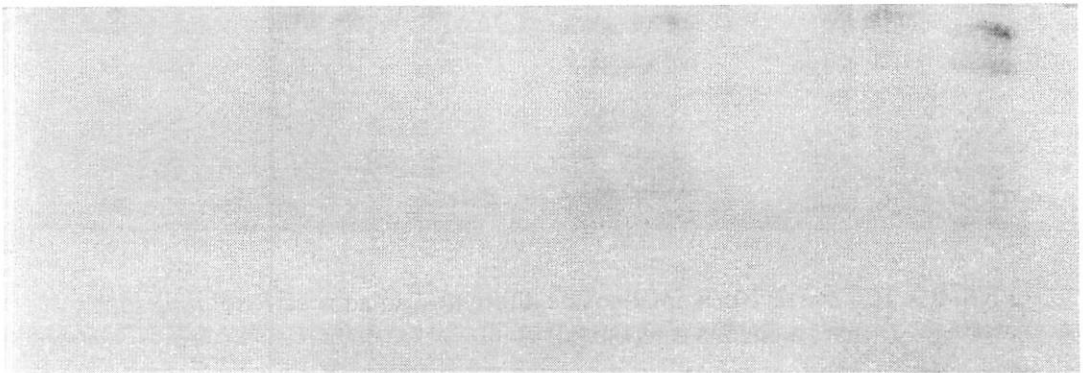


FIGURA 9 – Perfis isoenzimáticos de diferentes isolados de *Pisolithus* spp. para enzima fosfatase ácida - ACP

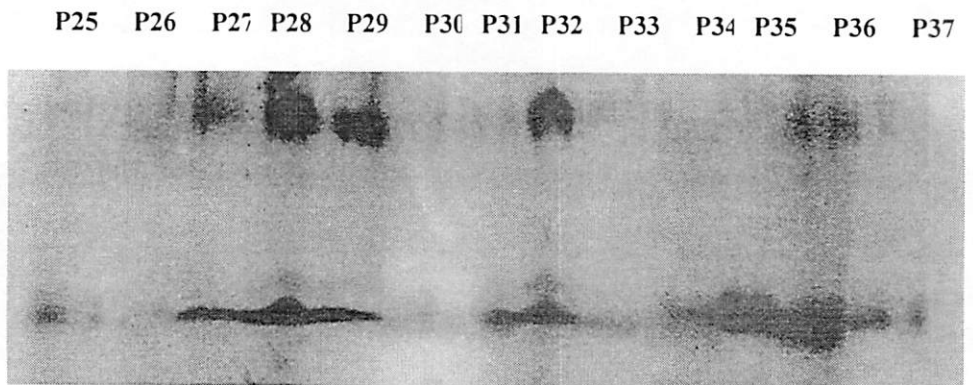
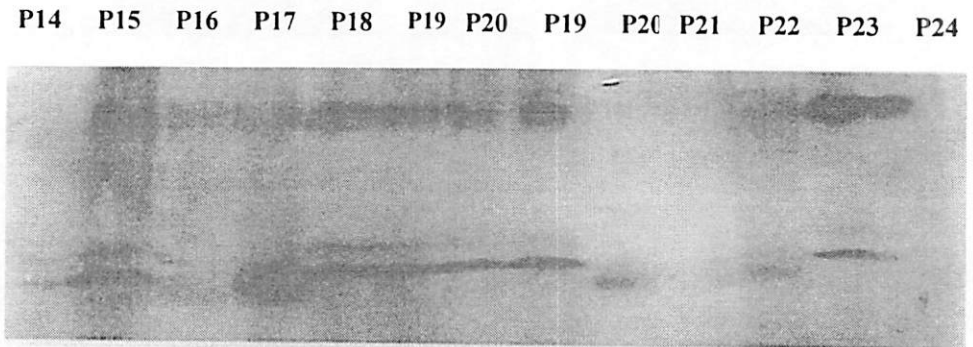
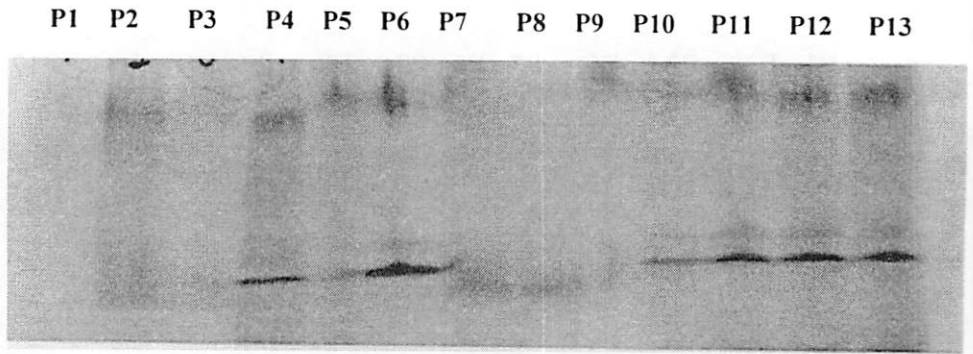
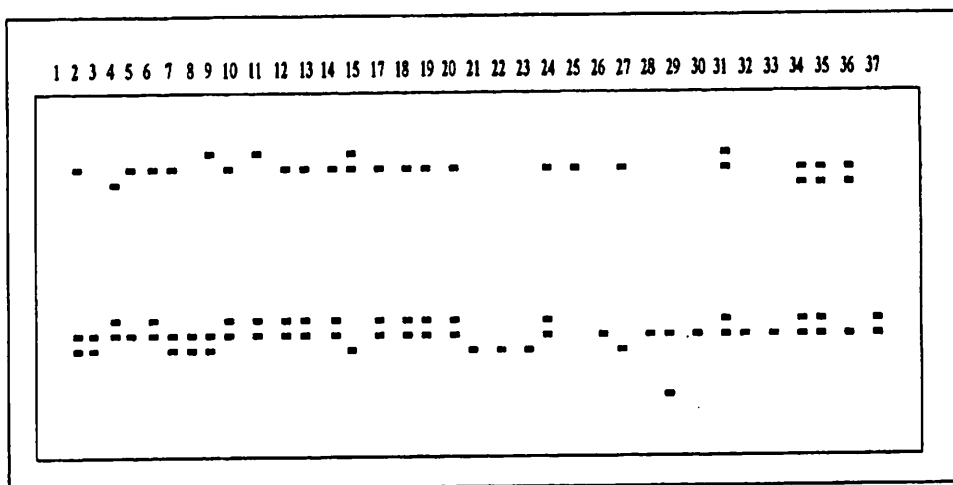
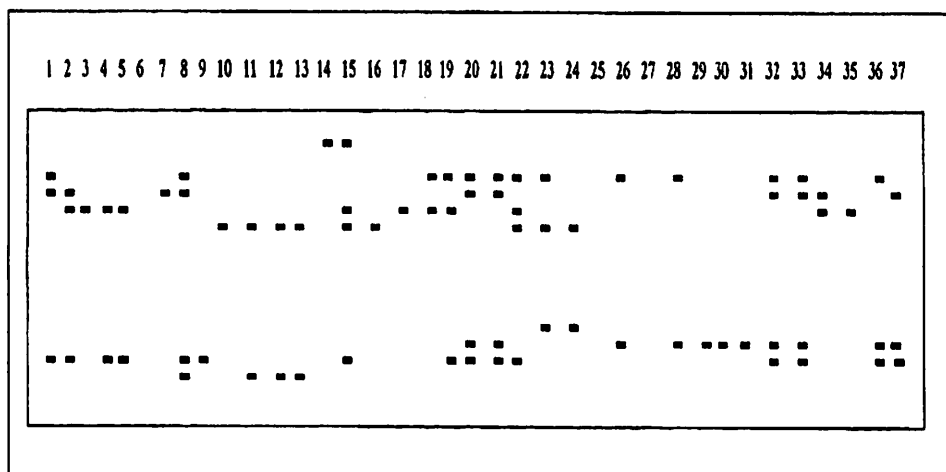


FIGURA 10 – Perfis isoenzimáticos de diferentes isolados de *Pisolithus* spp. para a enzima esterase – EST.



FIGURAS 11 e 12 – Zimogramas obtidos dos perfis isoenzimáticos de isolados de *Pisolithus* spp.

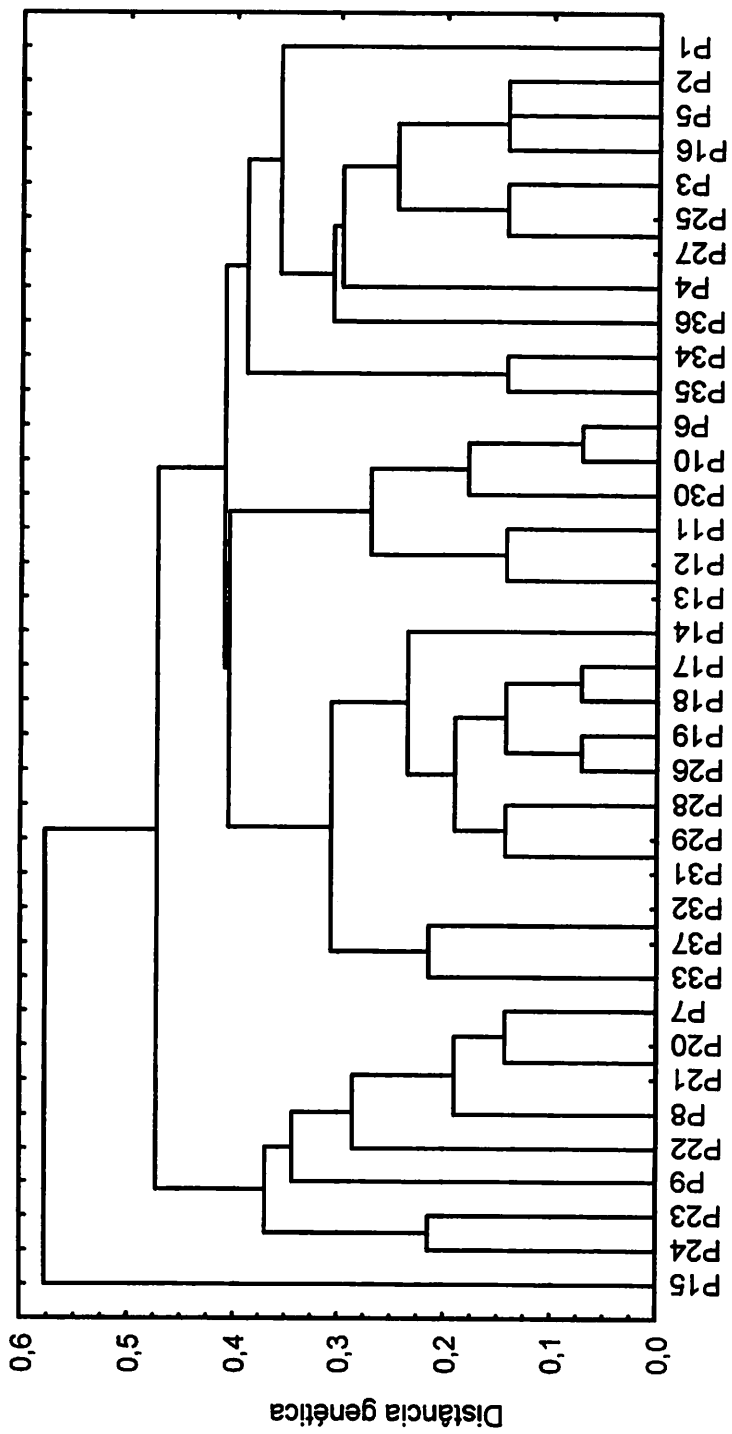


FIGURA 13 – Dendrograma obtido pelas análises dos perfis de isoenzimáticos de *Pisolithus* spp.

As análises dos zimogramas permitiram detectar 14 bandas polimórficas, sendo sete para a enzima ACP e sete para a enzima EST. Dois locos distintos foram detectados para os sistemas enzimáticos analisados (Tabela 20)

TABELA 20 – Enzimas, código, número de bandas e locos observados em diferentes isolados de *Pisolithus* spp.

Enzima	Abreviações usadas no estudo	Código da enzima	Bandas polimórficas	Locos distintos
Fosfatase ácida	ACP	3.1.3.2	7	2
Esterase	EST	3.1.1.1	7	2
Total			14	4

A análise binária dos perfis isoenzimáticos possibilitou a construção de uma matriz de dissimilaridade (Anexo 1D). A partir desta matriz foi obtido o dendrograma utilizando o método de agrupamento UPGMA, o qual pode ser observado na Figura 13. A análise dos perfis isoenzimáticos permitiu agrupar os isolados de *Pisolithus* spp. que apresentaram características semelhantes.

Analisando o dendrograma formado pelo agrupamento dos perfis isoenzimáticos, verificou-se que a 55% de similaridade, foram formados 3 grupos. O grupo 1, formado pelo isolado P15 (MB2 x (MB2xMB3) ZI); o grupo 2, formado por oito isolados: [P24 (MA1 x 441 ZI), P23 (MA1 x H6 ZI), P9 (MB2 x (MB2xMB3) S4-), P22 (MA1 x MB2 ZI), P8 (MA1 x (MA1xMB3) S3+), P21 (MA1 x MB3 ZI), P20 (MB2 x MB3 ZI) e P7 (MA1 x (MB2xMB3)S4+)]; e o grupo 3, formado por 28 isolados: [P33 (270 x H6 ZI), P37 (441), P32 (441 x I1 ZI), P31 (H6 x I1 ZI), P29 (MB3 x I1 ZI), P28 (MB3 x 441 ZI), P26 (MB2 x 441 ZI), P19 (MB3 x 270 ZI), P18 (MB2 x 270 ZI), P17 (MB3 x H6 ZI), P14 (MA1 x 270 ZI), P13 (MB3 x 270 S4+), P12 (MB2 x 270 S4+), P11 (MB3 x H6 S4-), P30 (H6 x 441 ZI), P10 (MB2 x H6 S4+), P6 (MA1 x 270 S3+), P35 (270 x I1 ZI), P34 (270 x 441 ZI), P36 (I1), P4 (270), P27

(MB2 x I1 ZI), P25 (MA1 x I1 ZI), P3 (MB3), P16 (MB2 x H6 ZI), P5 (H6), P2 (MB2) e P1 (MA1)]. No grupo 2, verificou-se que os isolados P7 e P20 foram os mais próximos, com similaridade de 85%, e que os isolados P24 e P23 foram os mais divergentes. O grupo 3 foi o que agrupou um maior número de isolados (75%). Verificou-se que os isolados P26, P19, P18, P17, P10 e P6 foram os mais próximos, com similaridade de 93%. O isolado P13 foi o mais divergente do grupo.

O agrupamento dos isolados pelo método UPGMA possibilitou fazer uma distinção com relação à distribuição dos isolados em cada grupo. Observou-se que no grupo 2 predominaram os híbridos obtidos dos genitores monocarióticos brasileiros (P1, P2 e P3). Dos 7 híbridos formados, 6 (P7, P8, P9, P20, P21 e P22) encontram-se neste grupo.

O grupo 3 foi formado basicamente por todos os híbridos obtidos dos genitores dicarióticos (P4, P5, P36 e P37).

De acordo com o agrupamento dos perfis isoenzimáticos, o isolado P15 foi o mais divergente, e este se assemelha aos demais, com índice de similaridade de 43%.

Resultados semelhantes foram encontrados para *Suillus* por (Karkouri, Cleyet-Marel e Mousain, 1996), que utilizaram variação isoenzimática e incompatibilidade somática no estudo de variação genética intraespecífica e agruparam os isolados de *Suillus collinitus* em dois grupos, com uma similaridade de 65%. Os autores verificaram que isolados com fenótipos isoenzimáticos idênticos foram somaticamente compatíveis e foram considerados como sendo os mesmos. Ao contrário, os isolados que apresentaram perfis diferentes foram somaticamente incompatíveis e estes corresponderam a genótipos distintos.

Os perfis isoenzimáticos demonstraram diferenças entre os isolados. Observou-se um polimorfismo enzimático tanto para ACP quanto para EST.

Estes resultados concordam com os obtidos por Zhu (1988), Sen (1990) e Keller (1992), que encontraram diferenças nos perfis enzimáticos em espécies de *Suillus*.

A distância média entre os isolados foi de 40%, e a amplitude das distâncias variou de 0 a 79%. Estes resultados demonstraram que existem boas possibilidades de ganho genético se os isolados de *Pisolithus* spp. forem cruzados para gerar híbridos. A alta amplitude das distâncias possibilita a manipulação destes isolados em programas de melhoramento de simbiose, permitindo a seleção de genótipos que ampliam a base genética a ser estudada. Os isolados P13 e P18, P15 e P23 apresentaram distâncias entre si superiores a 73% e 79% de divergência. Os isolados P12 e P13, P20 e P21, P26 e P27, P29 e P31, P32 e P3, pelas análises de seus perfis enzimáticos, foram semelhantes.

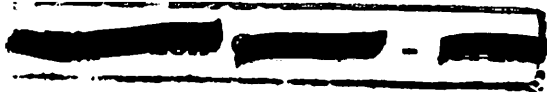
Utilizando-se a composição de agrupamento obtido pelo método UPGMA, foi construída uma matriz de distância entre e dentro dos 3 grupos obtidos e também foram identificados quais os isolados promissores para maximização das distâncias entre os grupos (Tabela 21).

TABELA 21 – Matriz de distância genética (%) entre os grupos definidos na caracterização morfológica dos isolados de *Pisolithus* spp.

	G1	G2	G3
G1	X		
G2	50% (P7/P15)	43%* (P20-P23)	
G3	71% (P15/P18)	57% (P24/P18, P23/17,P23P10)	73%* (P18/P13)

* na diagonal – maximização das distâncias dentro dos grupos
 abaixo da diagonal: maximização das distâncias entre os grupos

Para o grupo G2, as distâncias entre os grupos foram maiores do que dentro dos grupos (Tabela 21), isto indica que a variabilidade genética poderá



ser aumentada por cruzamentos realizados entre os isolados destes grupos. Para o grupo G3, a distância dentro do grupo foi maior do que entre os grupos, o que indica que a variabilidade será aumentada se os isolados (P18 e P13) forem cruzados, como mostrado na Tabela 21.

4.5 Diversidade genética de isolados de *Pisolithus* spp.

Resultados de literatura mostraram uma grande variação no número de oligonucleotídeos utilizados como iniciadores para gerar fragmentos de DNA. Dela Bastide et al. (1994, 1995 a e b) utilizaram 6 e 3 oligonucleotídeos, respectivamente, em *Laccaria bicolor*, Anderson, Chambers e Cairney et al. (1998) utilizaram 2 oligonucleotídeos em *Pisolithus* e Junghans et al. (1998) utilizou 13 oligonucleotídeos em *Pisolithus tinctorius*.

A Tabela 22 lista os 20 oligonucleotídeos utilizados e também o número de fragmentos polimórficos de cada um. Estes oligonucleotídeos possibilitaram a identificação de 345 fragmentos de DNA. Todos os fragmentos de DNA foram polimórficos. O número de fragmentos de DNA analisados para cada oligonucleotídeo variou de 26 a 1, correspondendo uma média de 17 fragmentos de DNA por oligonucleotídeo. Os fragmentos de DNA amplificados para dois oligonucleotídeos podem ser visualizados na Figura 14.

Com base nos dados de presença e ausência dos fragmentos amplificados, foi possível detectar a variação das distâncias genéticas entre os cinco isolados estudados, apresentada na Tabela 23.

As maiores distâncias genéticas foram observadas para o isolado P4 (em média 62%). Este, considerado alto, aliado ao fato deste isolado ser específico em colonizar raízes de *Pinus*, pode induzir a classificação de isolados de *Pisolithus* pela sua capacidade de colonizar hospedeiros específicos.

FIGURA 14 - Eletroforese em gel de agarose mostrando padrões de bandamento de fragmentos de DNA por PCR com uso dos oligonucleotídeos OPH 18 e OPM 1.

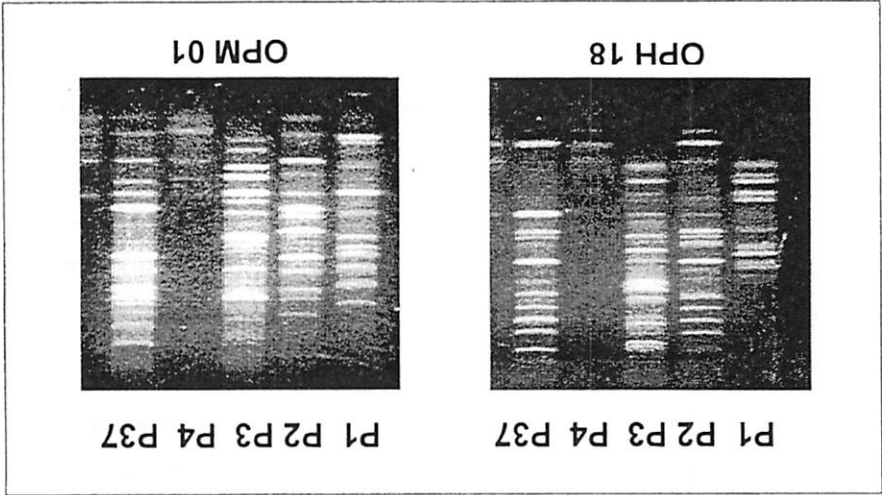


TABELA 22 - Oligonucleotídeos, seqüências de bases e número de fragmentos polimórficos.

Oligonucleotídeos polimórficos	Seqüência (5' → 3')	Número de fragmentos Polimórficos
OPA 09	GGGTAACGCC	21
OPC 13	AAGCCTCGTC	21
OPD 17	TTTCCACGG	12
OPH 08	GAACACCC	22
OPH 13	GACGCCACAC	21
OPH 15	AATGGCGCAG	21
OPH 18	GAATCGGCCA	24
OP1 02	GGAGGAGAGG	19
OPJ 14	CACCCGGATG	14
OPJ 18	TGGTCGCAGA	15
OPL 09	TGCGAGAGTC	5
OPM 01	GTTGGTACC	26
OPN 01	CTCACGTTGG	20
OPO 08	CCTCCAGTGT	12
OPQ 16	TCGGCGGTT	14
OPV 14	AGATCCCGCC	19
OPV 18	TGGTGGCGTT	16
OPX 04	CCGCTACCGA	18
OPZ 04	AGGCTGTGCT	24
OPZ 17	CCTTCCCACT	1
TOTAL		345

TABELA 23 – Matriz de dissimilaridade obtida a partir da análise binária dos fragmentos de DNA .

Isolados	P1	P2	P3	P4	P37
P1	0,00				
P2	0,14	0,00			
P3	0,48	0,52	0,00		
P4	0,63	0,65	0,59	0,00	
P37	0,48	0,47	0,34	0,65	0,00

Valores altos de distância genética também foram encontrados para outros fungos. Marmeisse, Debaud e Casselton. (1992) observaram elevado polimorfismo para *Hebeloma cylindrosporu*; Liu, Chambers e Cairney. (1998) em *Woollisia pungens*; Zhihuz, Makoto e Taizo (1999) para *Suillus grevillei*; Rossi et al., (2000) em *Tuber spp*.

A análise dos dados da matriz de distância genética possibilitou, pelo método UPGMA, a construção do dendrograma (Figura 15) que agrupou os isolados de acordo com os seus índices de similaridade. Pelo dendrograma, os isolados foram agrupados em dois grupos, com índice de similaridade de 55%. O grupo 1, formado pelo isolado P4 (270), e o grupo 2, pelos isolados P37 (441), P3 (MB3), P2 (MB2) e P1 (MA1). No grupo 1, verificou-se que os isolados P1 (MA1) e P2 (MB2) foram os mais próximos, com um índice de similaridade de 86%, e que os isolados P37 (441) e P3 (MB3) foram os mais divergentes. Para os 5 isolados estudados, o P4 (270) foi o mais divergente.

4.6 Comparação de agrupamento formados pelos diferentes marcadores

Os marcadores morfológicos, protéicos e genéticos possibilitaram detectar diferenças entre os cinco isolados (P1, P2, P3, P4 e P37) de *Pisolithus* analisados.

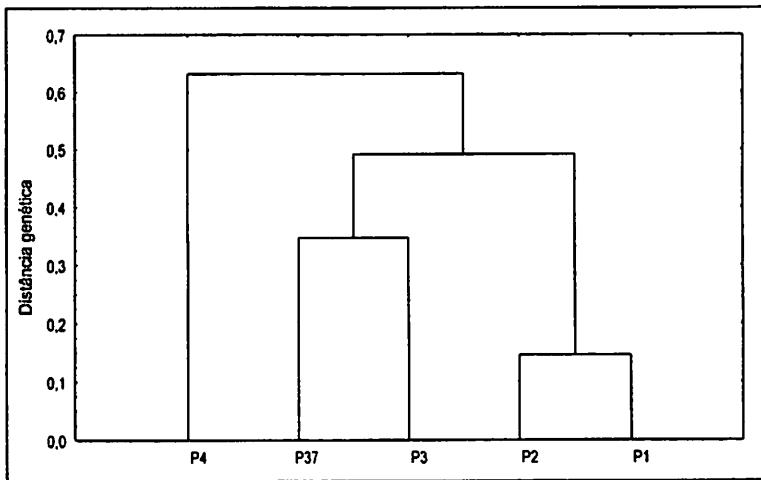


FIGURA 15 – Dendrograma obtido pelo método de agrupamento UPGMA de *Pisolithus* spp., baseado no coeficiente de similaridade Simple Matching.

As avaliações das características morfológicas revelaram diferenças entre os cinco isolados estudados, estas podem ser observadas na Tabela 24. O isolado mais divergente dos demais foi o P4 (27%), e os mais semelhantes foram o P2 e P3 (90% de similaridade).

TABELA 24 – Matriz de dissimilaridade obtida a partir das análises das características morfológicas dos isolados de *Pisolithus* spp.

Isolados	P1	P2	P3	P4	P37
P1	0,00				
P2	0,37	0,00			
P3	0,28	0,10	0,00		
P4	0,73	0,73	0,73	0,00	
P37	0,28	0,37	0,37	0,44	0,00

Os dados da matriz de dissimilaridade possibilitaram a construção do dendrograma pelo método UPGMA (Figura 20). Pela análise do dendrograma, notou-se a separação dos isolados de *Pisolithus* spp. em dois grupos, com um índice de similaridade de 55%. O grupo 1 foi formado pelo isolado P4 (270) e o grupo 2 pelos isolados P3 (MB3), P2 (MB2), P37 (441) e P1 (MA1). No grupo 1, verificou-se que os isolados P3 (MB3) e P2 (MB2) foram os mais próximos morfologicamente, com similaridade de 90%, e que o P37 (441) e P1 (MA1) foram os mais divergentes. O isolado P4 (270) foi o mais divergente de todos os analisados.

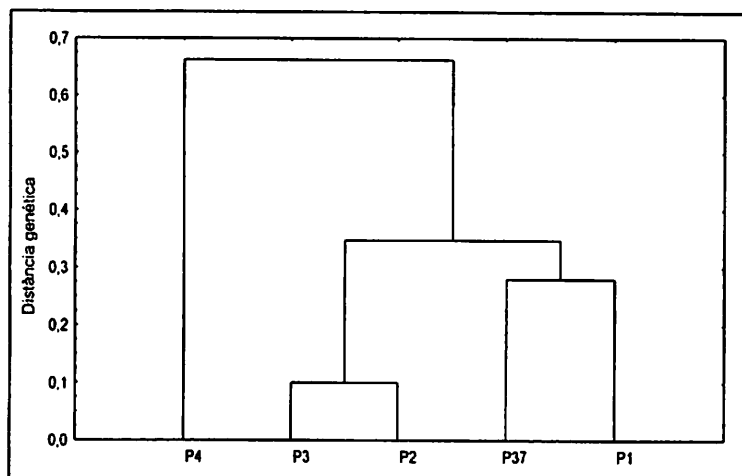


FIGURA 16 – Dendrograma obtido a partir das análises das características morfológicas dos isolados de *Pisolithus* spp.

As análises dos perfis de polipeptídeos revelaram diferenças entre os cinco isolados estudados e podem ser observadas na Tabela 25. Os isolados mais divergentes dos demais foram o P2 e P1 (57%), e os mais semelhantes foram o P3 e P4 (70% de similaridade).

TABELA 25 – Matriz de dissimilaridade obtida a partir das análises dos perfis de polipeptídeos dos isolados de *Pisolithus* spp.

Isolados	P1	P2	P3	P4	P37
P1	0,00				
P2	0,43	0,00			
P3	0,68	0,56	0,00		
P4	0,43	0,37	0,31	0,00	
P37	0,46	0,46	0,40	0,46	0,00

O dendrograma obtido a partir das análises dos perfis protéicos é apresentado na Figura 17.

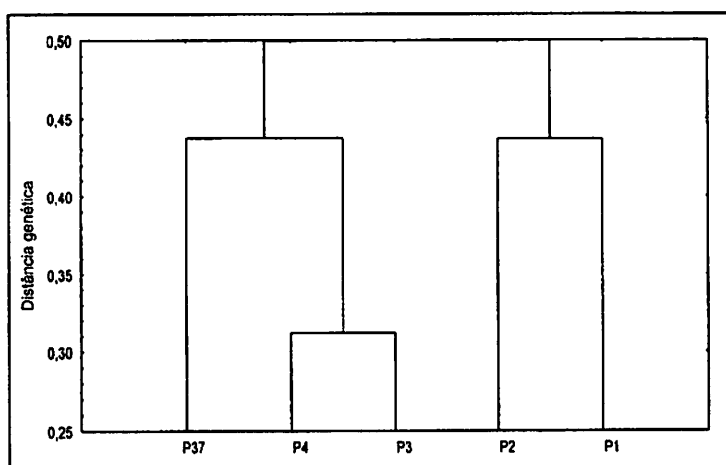


FIGURA 17 – Dendrograma obtido a partir das análises dos perfis de polipeptídeos dos isolados de *Pisolithus* spp.

Pela análise do dendrograma, notou-se a separação dos isolados em dois grupos, com um índice de similaridade de 55%. O grupo 1 foi formado pelos isolados P37 (441), P4 (270) e P3 (MB3) e o grupo 2, pelos isolados P2 (MB2) e P1 (MA1). No grupo 1, verificou-se que os isolados P4 (441) e P3 (MB3) foram os mais próximos, com um índice de similaridade de 68%, e que o isolado P37

(441) foi o mais divergente. No grupo 2, verificou-se que os P2 (MB2) e P1 (MA1) apresentaram 56% de similaridade.

5 – CONCLUSÕES

Todos os isolados de *Pisolithus* spp. apresentaram maior crescimento, variação genética e herdabilidade aos 28 dias de cultivo em meio MMN. Desta forma todos os demais estudos de diversidade foram realizados neste período

As características morfológicas, os marcadores bioquímicos e moleculares permitiram detectar a diversidade dos isolados de *Pisolithus* spp.

Os cruzamentos de isolados potenciais para ampliar a base genética, indicados pelo uso das características morfológicas, foram P4 (270) e P21(MA1 x MB3 ZI) e P4 (270) e P25 (MA1 x I1 ZI).

Os cruzamentos de isolados potenciais para ampliar a base genética, indicados pelo uso dos marcadores protéicos foram P10 (MB2 x H6 S4+) e P31(H6 x I1 ZI), P13 (MB3 x 270 S4+) e P29 (MB3 x I1 ZI), P13(MB3 x 270 S4+) e P30 (H6 x 441 ZI), P18 (MB2 x 270 ZI) e P29 (MB3 x I1 ZI) e P20 (MB2 x MB3 ZI) e P31(H6 x I1 ZI).

Os cruzamentos de isolados potenciais para ampliar a base genética, indicados pelo uso dos marcadores enzimáticos, foram P13 (MB3 x 270 S4+) e P18(MB2 x 270 ZI) e P15 [MB2 x (MB2 x MB2)] e P33 (270 x H6 ZI).

O uso dos marcadores morfológicos, bioquímicos e moleculares permitiu o agrupamento dos isolados com relação às procedências geográficas. O isolado P4 (270), de origem americana, não se agrupou com os demais, de origem brasileira.

O marcador molecular (RAPD) foi o mais indicado para analisar a divergência genética, pois forneceu resultados mais seguros das distâncias genéticas.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGGANGAN, N.S.; DELL, B.; MALAJCZUK, N.; DE LA CRUZ, R. Soil fumigation and phosphorus supply affect the formation of *Pisolithus-Eucalyptus urophylla* ectomycorrhizas in two acid Philippine soils. **Plant Soil**, Dordrecht, v.180, p. 259-266, 1996.
- ALFENAS, C.A. **Eletoforese de isoenzimas e proteínas afins; fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos**. Viçosa: UFV, 1998. 574p.
- ALFENAS, A.C.; PETERS, I.; BRUCE, W; PASSADOS, G.C. **Eletoforese de proteínas e isoenzimas de fungos e essências florestais**. Viçosa: SIF, 1991. 292p.
- ANDERSON, I.C.; CHAMBERS, S.M.; CAIRNEY, J.W. Molecular determination of genetic variation in *Pisolithus* isolates from a defined region in New South Wales Australia. **New Phytologist**, New York, v.138, p. 151-162, 1998.
- ANDRADE, A.C.S.; OLIVEIRA, V.L.; QUEIROZ, M.H. *Status* micorrízico de plantas nativas da Floresta de Araucária e da Mata Atlântica em Santa Catarina. In: FERT'BIO 98, 1998, Caxambu. **Resumos...** Caxambu: [s.n.], 1998. p. 728.
- ANNE, J.; PEBERDY, J.F. Characterisation of inter-specific hybrids between *Penicillium chrysogenum* and *P. roqueforti* by isoenzyme analysis. **Transactions British Mycological Society**, London, v.77, p. 401-408, 1981.
- ANTI, A.B. **Caracterização de linhagens de soja e feijão através de eletoforese**. Piracicaba: ESALQ, 1991. 133p.
- BA, A.M.; THOEN, D. First synthesis of ectomycorrhizas between *Afzelia africana* Sm. (Casealpinoidea) na native fungi from West Africa. **New Phytologist**, New York, v.114, p. 99-103, 1990.
- BARROS, N.F., BRANDI, R.M., REIS, M.S. Micorriza em eucalipto (uma revisão sobre a morfologia, a fisiologia e os efeitos mútuos da associação planta-fungo). **Revista Árvore**, Viçosa, v. 2, n. 2, p. 130-140, 1978.

- BATTISTA, C.D.; SELOSSE, A.M.; BOUCHARD, D.; STENSTRÖM, E.; LE TACON, F. Variations in symbiotic efficiency, phenotypic characters and ploidy level among different isolates of the ectomycorrhizal basidiomycete *Laccaria bicolor* strain S 338. **Mycological Research**, Cambridge, v.11, p. 1315-1324, 1996.
- BERBEE, M.L.; TAYLOR, J.W. From 18S ribosomal sequence data to evolution of morphology among the fungi. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 1, p. 677-683, 1993.
- BÉREAU, M.; GARBAYE, J. First observations on the root morphology and symbioses of 21 major tree species in the primary tropical rain forest of French Guyana. **Annual Science Forest**, Paris, v.51, p. 407-416, 1994.
- BLUM, H.; BEIER, H.; GROSS, H.J. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. **Electrophoresis**, Weinheim, v.8, p. 93-99, 1987.
- BOUCIAS, D.G.; MCGOY, C.W.; JOSLYN, D.J. Isozyme differentiation among 17 geographical isolates of *Hisutella thompsonii*. **Journal of the Invertebrate Pathology**, v. 39, p. 329-337, 1982.
- BOUGHER, N.L.; MALAJCZUK, N. Effects of high soil moisture on formation of ectomycorrhizas and growth of Karri (*Eucalyptus diversicolor*) seedlings inoculated with *Descolea maculata*, *Pisolithus tinctorius* and *Laccaria laccata*. **New Phytologist**, New York, v.114, p. 97-91, 1990.
- BOUGHER, N.L.; SYME, K. **Fungi of Southern Australia**. Nedlands: University of Western Australia Press, 1998. 391p.
- BOULTIER, D.; THURMAN, D.A.; DERBYSHERE, E. A disc electrophoretic study of globulin proteins of legume seeds. **New Phytologist**, New York, v. 66, n. 1, p. 27-36, 1976.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, New York, v.72, p. 248-254, 1976.

- BRUNS, T.D.; SZARO, T.M.; GARDES, M.; CULLINGS, K.W.; PAN, J.J.; TAYLOR, D.L.; HORTON, T.R.; KRETZER, A.; GARBELOTTO, M.; LI, Y. A sequence database for the identification of ectomycorrhizal basidiomycetes by phylogenetic analysis. **Molecular Ecology**, Oxford, v.7, p. 257-272, 1998.
- BRUNS, T.D.; WHITE, T.J.; TAYLOR, J.W. Fungal molecular systematics. **Annual Rev. Ecology System**, Palo Alto, v.22, p. 525-564, 1991.
- BULLINI, L.; BIOCCHA, E.; CHEVALIER, G.; DUPRÉ, C.; FERRARA, A.M.; PALENZONA, M.; SALLICANDRO, P.; URBANELLI, S. Struttura clonale di alcune specie del genere *Tuber*. In: CONGRESSO DELLA SOCIETA' BOTANICA ITALIANA, 89, 1994. **Trabalhos apresentados...** [S.l.]: [s.n.], 1994. p. 128-151.
- BURDON, J.L.; MARSHALL, D.R.; LUIG, N.H. Isozyme analysis indicates that a virulent cereal rust pathogen is a somatic hybrid. **Nature**, Londres, v. 293, p. 565-566, 1981.
- BURDON, J.L.; MARSHALL, D.R.; LUIG, N.H.; GOW, D.J.S. Isoenzyme studies on the origin and evolution of *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* in Australia. **Australian Journal of Biological Sciences**, v.35, p. 231-238, 1988.
- BURGESS, T., DELL, B.; MALAJCZUK, N. Variation in mycorrhiza development and growth stimulation of 20 isolates of *Pisolithus* inoculated onto *Eucalyptus grandis* W. Hill ex Maiden. **New Phytologist**, New York, v.127, p. 731-739, 1994.
- BURGESS, T.; DELL, B.; MALAJCZUK, N.; BERNARD, D. Variation in *Pisolithus* based on basidiome and basidiospore morphology, culture characteristics and analysis of polypeptides using 1D SDS-PAGE. **Mycological Research**, Cambridge, v.99, n.1, p. 1-13, 1995.
- CAHN, W.K.; GRIFFITHS, D.A. The induction of mycorrhiza in *Eucalyptus myrcocorys* and *Eucalyptus torelliana* grown in Hong Kong. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v.43, p. 15-24, 1991.
- CAIRNEY, J.W.G.; CHAMBERS, S.M. Interactions between *Pisolithus tinctorius* and its hosts: a review of current knowledge. **Mycorrhiza**, Berlin, v.7, n.3, p. 117-131, 1997.

- CAO, W.; CRAWFORD, D.I. Carbon nutrition and hydrolytic and cellulolytic activities in the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius*. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.39, p. 529-535, 1993.
- CARLILE, M.J. Genetic exchange and gene flow: their promotion and prevention. In: RAYNER, A.D.M.; BRASIER, C.M.; MOORE, D. (eds). **Evolutionary biology of the fungi**. Cambridge: Cambridge University Press, 1987. p. 203-214.
- CARRARO, D.M. **Variação e herança dos padrões eletroforéticos em órgãos e estágios de desenvolvimento em milho (*Zea mays* L.)**. Piracicaba: ESALQ, 1990. 121p.
- CARVALHO, D. **Contribution a l'étude des protéines régules par la symbiose ectomycorhizienne**. Caractérisation des protéines membranaires et pariétales de l'ectomycorhize d'*Eucalyptus globulus*-*Pisolithus tinctorius*. Nancy: INRA-ENGREF, 1994. 128p.
- CARVALHO, D.; ROSADO, S.C.S.; SOUZA, AM.; OLIVEIRA, AF. Produção de culturas monocarióticas e compatibilidade sexual intra e interpopulacional para o fungo ectomicorrízico *Pisolithus tinctorius* (Pers) Coker & Couch. **Cerne**, Lavras, v. 4, não paginado, 1997.
- CASSELTON, L.; ECONOMOU, A. Dikaryon formation. In: MOORE, D.; CASSELTON, L.; WOOD, D.A.; FRANKLAND, J.C. (eds). **Development biology of higher fungi**. Cambridge: Cambridge University Press, 1985. p. 213-229.
- CASTELLANO, M.A. Current estatus of outplanting studies using ectomycorrhiza-inoculated forest trees. In: PFLEGER, F.L.; LINDERMAN, R.G. (eds.). **Mycorrhizae and plant health**. Saint Paul: APS Press, 1994, p. 261-281.
- CLINE, M.L.; FRANCE, R.C.; REID, C.P.P. Intraspecific and interspecific growth variation of ectomycorrhizal fungi at different temperatures. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v.65, p. 869-875, 1987.
- COCHRANE, B.J.; BROWN, J.K.; WAIN, R.P.; YANGCO, B.G.; STRAKE, D. Genetic studies in the genus *Basidiobolus*. I. Isozyme variation among isolates of humam and natural populations. **Mycologia**, New York, v.81, p. 504-513, 1989.

- COELHO, F.C. **Caracterização e incidência de fungos micorrízicos em povoamentos de *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh, nos municípios de Paraobeba, Bocaiúva e João Pinheiro, Minas Gerais.** Viçosa: UFV, 1993. 48p. (Dissertação - Mestrado em Microbiologia Agrícola).
- COLPAERT, J.V.; VAN ASSCHE, J.A.; JUIJTENS, K. The growth of the extramatrical mycelium of ectomycorrhizal fungi and the growth response of *Pinus sylvestris* L. **New Phytologist**, New York, v.120, p. 127-135, 1992.
- CRUZ, C. **Programa genes: aplicativo computacional em genética e estatística.** Viçosa: UFV, 1997. 442p.
- CUNNINGHAM, G.H. **The ggasteromycetes of Australia and New Zealand.** Dunedin: J. McIndoe, 1942. 236p.
- DEBAUD, J.C.G.; GAY, G.; BRUCHET, G. Intraespecific variability in an ectomycorrhizal fungus: *Hebeloma cylindrosporum*. I. Preliminary studies on *in vitro* fruiting spore germination and sexual comporment In: GIANINAZZI-PEARSON, V.; GIANINAZZI, S. **Physiological and Genetical Aspects of Mycorrhizae.** Paris: INRA, 1986. p. 581-588.
- DEBAUD, J.C.G. ; GAY, G.; PREVOST, J.L.; DESHEIMER, J. Ectomycorrhizal ability fo genetically different homocaryotic and dikaryotic mycelia of *Hebeloma cylindrosporum*. **New Phytologist**, New York, v.108, p. 323-328, 1988.
- DE BRUIJN, D.M.E.; McSPADDEN-GARDENER, B.; MILLCAMPS, A.; RADEMAKER, J.L.W.; RAGATZ, M.L.; SCHULTZ, P.; STRUFFI, P.; STOLTZFUS, F. Molecular approaches in microbial ecology to assess genomic deversity and stress-induced gene expression in plant-associated diazotrophs. In: ELMERICH, C. et al. (eds.). **Biological nitrogen fixation for the 21 st Century.** Netherlands: [s.n.], 1998. p. 571-576.
- DELA BASTIDE, P. **Population ecology and genetics of the ectomycorrhizal basidiomycete *Laccaria bicolor* (Maire) Orton.** Québec: Université Laval, 1994. 129p. (PhD. Thesis).
- DELA BASTIDE, P.; KROPP, B.R.; PICHÉ, Y. Mecanisms for the development of genetically variable micorrhizal micelia in the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.62, n.10, p. 3609-3616, 1995a.

- DELA BASTIDE, P.; KROPP, B.R.; PICHÉ, Y. Population structure and mycelial phenotypic variability of the ectomycorrhizal basidiomycete *Laccaria bicolor* (Maire) Orton. **Mycorrhiza**, Berlin, v.5, p. 371-379, 1995b.
- DELA BASTIDE, P.; KROPP, B.R.; PICHÉ, Y. Spatial distribution and temporal persistence of discrete genotypes of the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor* (Maire) Orton. **New Phytologist**, London, v.127, p. 547-556, 1994.
- DUDDRIDGE, J.A. Specificity and recognition in ectomycorrhizal associations. In: PEGG, G.F.; AYRES, P.G. (eds.). **Fungal infection of plants**. Cambridge: British Mycological Society, 1987. não paginado.
- DUPUY, N.; WILLEMS, A.; POT, B.; DEWETTINCK, D.; VANDENBRUAENE, I. Phenotypic and genotypic characterization of *Bradyrhizobia* nodulating the Leguminous tree *Acacia albida*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 44, n.3; p. 461-473, July 1994.
- EK, H. The influence of nitrogen fertilization on the carbon economy of *Paxillus involutus* in ectomycorrhizal association with *Betula pendula*. **New Phytologist**, New York, v.135, p. 133-142, 1997.
- ESSER, K.; MEINHARD, F. Ectomycorrhizal fungi: state of the art, application and perspectives of research under consideration of molecular biology. **Symbiosis**, Rehovot, v.2, p. 125-137, 1986.
- FOGEL, R. Quantification of sporocarp production by hypogeous fungi. In: Wicklow, D.T.; Carroll, G.C. (eds). **The fungal community, its organization and role in the ecosystem**. New York: Basel, 1981. p. 553-568.
- FRIES, N.; MUELLER, G.M. Incompatibility systems, cultural features and species circumscriptions in the ectomycorrhizal genus *Laccaria* (Agaricales). **Mycologia**, New York, v.76, p. 633-642, 1984.
- FRIES, N.; SUN, P. The mating system of *Suillus bovinus*. **Mycological Research**, Cambridge, v.96, p. 237-238, 1992.

- GARDES, M.; FORTIN, J.A.; MUELLER, G. M.; KROPP, B.R. Mitochondrial DNA polymorphisms in four *Laccaria* species: *L. bicolor*, *L. laccata*, *L. proxima* and *L. amethystina*. **Mycological Research**, Cambridge, v.95, p. 206-216, 1991a.
- GARDES, M.; WHITE, T.W.; FORTIN, J.A.; BRUNS, T.D.; TAYLOR, J.W. Identification of indigenous and introduced symbiotic fungi in ectomycorrhizae by amplification of nuclear and mitochondrial ribosomal DNA. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 69, p. 180-190, 1991b.
- GARDES, M.; FORTIN, J.A.; MUELLER, G.M.; KROPP, B.R. Restriction fragment length polymorphisms in the nuclear ribosomal DNA of four *Laccaria* spp.; *L. bicolor*, *L. laccata*, *L. proxima* and *L. amethystina*. **Phytopathology**, Lancaster, v.80, p. 1312-1317, 1990.
- GAY, G.; DEBAUD, J.C. Genetic study on indole-3-acetic acid productions by ectomycorrhizal *Hebeloma* species: inter and intraspecific variability in homo and dikaryotic mycelia. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v.26, p. 141-146, 1987.
- GAY, G.; MARMEISSE, R.; FOUILLET, P.; BOULETREAU, M.; DEBAUD, J.C. Genotype/nutrition interactions in the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum* Romagnesi. **New Phytologist**, New York, v.123; p. 335-343, 1993.
- GIACHINI, A.J.; OLIVEIRA, V.L. Ectomycorrhizal fungi in *Eucalyptus* and *Pinus* plantations in Santa Catarina (Southern Brazil). In: International Conference on Mycorrhizas, 1., 1996, Berkeley. **Abstracts...** Berkeley: [s.n.], 1996. p. 52
- GOMES, E.A.; BARROS, G.E.; KASUYA, M.C.M.; ARAÚJO, E.F. Molecular characterization of *Pisolithus* spp. Isolates by rDNA PCR-RFLP. **Mycorrhiza**, Berlin, v.8, p. 197-202, 1999.
- GUIMARÃES, L., G. **Caracterização de fungos micorrízicos em povoamentos de *Eucalyptus* spp. em Aracruz e São Mateus, Espírito Santo e Dionísio, Minas Gerais**. Viçosa: UFV, 1993. 46p. (Dissertação - (Mestrado em Microbiologia Agrícola).
- HALL, R. Proteins and catalase isoenzymes from *Fusarium solani* and their taxonomic significance. **Australian Journal of Biological Sciences**, v.20, p. 419-428, 1967.

- HARLEY, J.L.; SMITH, S.E. **Mycorrhizal symbiosis**. London: Academic Press, 1983. 483p.
- HENRION, B.; LE TACON, F.; MARTIN, F. Rapid identification genetic variation of ectomycorrhizal fungi by amplification of ribosomal DNA genes. **New Phytologist**, New York, v.122, p. 289-298, 1992.
- HEPPER, C.M.; SEN, R.; AZCON-AGUILAR, C.; GRACE, C. Variation in certain isozymes amongst different geographical isolates of the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi *Glomus clarum*, *Glomus monosporum* and *Glomus mosseae*. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.20, p. 51-59, 1988.
- HILBERT, J.L.; COSTA, G.; MARTIN, F. Ectomycorrhizal synthesis and polypeptide changes during the early stage of eucalypt mycorrhiza development. **Plant Physiology**, v.97, p. 977-984, 1991.
- HILBERT, J.L.; MARTIN, F. Regulation of gene expression in ectomycorrhizas. Protein changes and the presence of ectomycorrhizas specific polypeptides in the *Pisolithus-Eucalyptus* symbiosis. **New Phytologist**, New York, v.110, p. 339-346, 1988.
- HILGER, A.B.; THOMAS, K.I. KRAUSE, H.H. The effects of several buffers on growth and phosphorus nutrition of selected ectomycorrhizal fungi. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.18, p. 61-67, 1986.
- HO, I. Acid phosphatase, alkaline phosphatase, and nitrate reductase activity of selected ectomycorrhizal fungi. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v.67, p. 750-753, 1989.
- HO, I. Comparison of eight *Pisolithus tinctorius* isolates for growth rate, enzyme activity and phytohormone production. **Canadian Journal of Forestry Research**, Ottawa, v.17, p. 31-53, 1987.
- HOLMER, L.; STENLID, J. Population structure and mating system in *Marasmius androsaceus* Fr. **New Phytologist**, New York, v.119, p. 307-314, 1991.
- HUNG, L.L.; TRAPPE, J.M. Growth variation between and within species of ectomycorrhizal fungi in response to pH "in vitro". **Mycologia**, New York, v.75, p. 231-241, 1983.

- HUTCHISON, L.J. Studies on the systematics of ecomycorrhizal fungi in axenic culture. II. The enzymatic degradation of selected carbon and nitrogen compounds. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v.68, p. 1522-1530, 1990.
- IMAÑA, J.; PRADO JUNIOR., A.C. Efeito do fungo *Pisolithus tinctorius* (Pers.) Coker no desenvolvimento inicial de *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden. **Silvicultura**, São Paulo, v.14, p. 347-349, 1973.
- JACOBSON, K.M.; MILLER, O.K. Physiological variation between tree-associated populations of *Suillus granulatus* as determined by in vitro mycorrhizal synthesis experiments. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, 70: 26-31, 1992.
- JACOBSON, K.M.; MILLER, O.K.; TURNER, B.J. Randomly amplified polymorphic DNA markers are superior to somatic incompatibility tests for discriminating genotypes in populations of the ectomycorrhizal fungus *Suillus granulatus*. **Proc. Natl. Acad. Sc.**, v.90, p. 9159-9163, 1993.
- JOSLYN, D.J.; BOUCIAS, D.G. Isozyme differentiation among three pathotypes of the entomogenous fungus *Nomuraea rileyi*. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 27, p. 364-366, 1981.
- JUNGHANS, D.T.; GOMES, E.A.; GUIMARÃES, W.V.; BARROS, E.G.; ARAÚJO, E.F. Genetic diversity of the ectomycorrhizal fungus based on RAPD-PCR analysis. **Mycorrhiza**, Berlin, v.7, p. 243-248, 1998.
- KARKOURI, K.; CLEYET-MAREL, J.D.; MOUSAIN, D. Isozyme variation and somatic incompatibility in populations of the ectomycorrhizal fungus *Suillus collinitus*. **New Phytologist**, New York, v.134, p. 143-153, 1996.
- KELLER, G. Isozymes in isolates of *Suillus* species from *Pinus cembra* L. **New Phytologist**, New York, v.120, p. 351-358, 1992.
- KENDRICK, B.; BERCH, S.M. Mycorrhizae: applications in agriculture and forestry. In: ROBINSON, C.W. (ed.). **Comprehensive biotechnology**. Oxford: Pergamon Press, 1985. v.3, p. 109-152.
- KOPE, H.H.; FORTIN, J.A. Germination and comparative morphology of basidiospores of *Pisolithus arhizus*. **Mycologia**, New York, v.82, p. 350-357, 1990.

- KROPP, B.R. Variable interactions between non-mycorrhizal and ectomycorrhizal strains of the basidiomycete *Laccaria bicolor*. **Mycological Research**, Cambridge, v.94, p. 412-415, 1990.
- KROPP, B.R.; ANDERSON, A.J. Molecular and genetic approaches to understanding variability in mycorrhizal formation and functioning. In: PFLEGER, F.L.; LINDERMAN, R.G. (eds.). **Mycorrhizae and plant health**. Saint Paul: APS Press, 1994. p. 309-336.
- KROPP, B.R.; FORTIN, J.A. The incompatibility system and relative ectomycorrhizal performance of monokaryons and reconstituted dikaryons of *Laccaria bicolor*. **Canadian Journal of Botany**, v.66, p. 289-294, 1988.
- KROPP, B.R.; LANGLOIS, C.G. Ectomycorrhizae in reforestation. **Canadian Journal of Forest Research**, Ottawa, v.20, p. 438-451, 1990.
- KROPP, B.R.; McAFEE, B.J.; FORTIN, J.A. Variable loss of ectomycorrhizal ability in monokaryotic and dicaryotic cultures of *Laccaria bicolor*. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v.65, p. 500-504, 1987.
- LAMHAMEDI, M.S.; BERNIER, P.Y.; FORTIN, J.A. Growth, nutrition and response to water stress of *Pinus pinaster* inoculated with *Pisolithus* sp. **Tree Physiol**, v.10, p. 153-167, 1992.
- LAMHAMEDI, M.S.; FORTIN, J.A. Genetic variations of ectomycorrhizal fungi: extramatrical phase of *Pisolithus* sp. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v.69, p. 1927-1934, 1991.
- LAMHAMEDI, M.S.; FORTIN, J.A.; KOPE, H.H.; KROPP, B. R. Genetic variation in ectomycorrhiza formation by *Pisolithus arhizus* on *Pinus pinaster* and *Pinus banksiana*. **New Phytologist**, New York, v.115, p. 689-697, 1990.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, Londres, v.227, p. 680-685, 1970.
- LEI, J.; LAPEYRIE, F.; MALAJCZUK, N; DEXHEIMER, J. Infectivity of pine and eucalypt isolates of *Pisolithus tinctorius* (Pers) Coker & Couch on roots of *Eucalyptus urophylla* S. T. Blake *in vitro*. II Ultrastructural and biochemical changes at the early stage of mycorrhiza formation. **New Phytologist**, New York, v.116, p. 115-122, 1990.

- LE PAGE, B.A.; CURRAH, R.S.; STOCKEY, R.A.; ROTHWELL, G.W. Fossil ectomycorrhizae from the middle Eocene. **American Journal of Botany**, Ohio, v.84, p. 410-412, 1997.
- LE TACON, F., ALVAREZ, I.F.; BOUCHARD, D.; HENRION, B.; JACKSON, R.M.; LUFF, S.; PARLADE, J.I.; PERA, J.; STENSTROM, E.; VILLENEUVE, N.; WALKER, C. Variations in field response of forest trees to nursey ectomycorrhizal inoculation in Europe. In: READ, D.J.; LEWIS, D.H.; FITTER, A.H.; ALEXANDER, I.J. (eds). **Mycorrhizas in ecosystems**. Cambridge: CAB International, 1992. p. 119-134.
- LE TACON, F.; GARBAYE, J.; CARR, G. The use of mycorrhizas in temperate and tropical forests. **Symbiosis**, Rehovot, v.3, p. 179-206, 1987.
- LILLY, W.W.; CHARVAT, I. Activities and isozymes of acid phosphatase in *Schizophyllum commune*; a re-examination. **Mycologia**, New York, v.79, p. 314-319, 1987.
- LIU, G.; CHAMBERS, S.M.; CAIRNEY, W.G. Molecular diversity of ericoid mycorrhizal endophytes isolated from *Woollisia pungens*. **New Phytologist**, New York, v.140, p. 145-153, 1998.
- MAGHARABI, H.A.; KISH, L.P. Isozyme characterization of Ascosphaerales associated with bees. IV. Analyses. **Mycologia**, New York, v.79, p. 519-523, 1987a.
- MAGHARABI, H.A.; KISH, L.P. Morphological and isozyme survey of chalkbood disease of alfafa leafculting bee in the Western United States. **Mycologia**, New York, v.79, p. 565-570, 1987b.
- MARMEISSE, R.; DEBAUD, J.C.; CASSELTON, L.A. DNA probes for species and strain identification in the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma*. **Mycological Research**, Cambridge, v.96, p. 161-165, 1992.
- MARTIN, F.; TOMMERRUP, I.C.; TAGU, D. Genetics of ectomycorrhizal fungi: progress and prospects. **Plant and Soil**, The Hague. v.159, p. 159-170, 1994.
- MARTIN, F.; ZAIYOU, M.; LE TACON, F.; RYGIEWICZ, P. Strain specific differences in ribosomal DNA from the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor* (Maire) Orton and *Laccaria laccata* (Scop ex Fr) Br. **Annual Science Forest**, v.48, p. 297-305, 1991.

- MARTIN, M.P.; HÖGBERG, N.; NYLUND, J.E. Molecular analysis confirms morphological reclassification of *Rhizopogon*. **Mycological Research**, Cambridge, v.7, p. 855-858, 1998.
- MARX, D.H. The influence of ectotrophic mycorrhizal fungi on the resistance of pine roots to pathogenic infection. I Antagonism of mycorrhizal fungi to root pathogenic infection fungi and soil bacteria. **Phytopathology**, Lancaster, v.59, p. 153-163, 1969.
- MARX, D.H. The practical significance of ectomycorrhizae in forest establishment. I. Ecophysiology of ectomycorrhizae of forest trees. In: MARCUS WALLENBERG FOUNDATION SYMPOSIA, 7., 1991, Stockholm. **Proceedings...** Stockholm: [s.n.], 1991, p. 54-90.
- MARX, D.H. Tree host range and world distribution of *Pisolithus tinctorius*. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.23, p. 217-223, 1977.
- MARX, D.H.; CORDELL, C.E.; MAUL, S.B.; RUEHLE, J.L. Ectomycorrhizal development on pine by *Pisolithus tinctorius* in bare-root and container seedling nurseries. I. Efficacy of various vegetative inoculum formulations. **New Forest**, Dodrecht, v.3, p. 45-56, 1989.
- MARX, D.H.; MAUL, S.B.; CORDELL, C.E. Application of specific ectomycorrhizal fungi in world forestry. In: LEATHAM, G.F. (ed). **Frontiers in Industrial Mycology**. New York: Chapman & Hall, 1992. p. 78-98.
- MAY, B.; ROYSE, D.J. Confirmation of crosses between lines of *Agaricus brunnescens* by isozyme analysis. **Experimental Mycology**, Orlando, v.6, p. 283-292, 1982.
- MEYER, F.H. Distribution of ectomycorrhizae in native and man-made forests. In: MARKS, G.C.; KOZLOWSKI, T.T. (eds.). **Ectomycorrhizae**. New York Academic Press, 1973. p. 79-105.
- MICALES, J.A.; BONDE, M.R.; PETERSON, G.L. The use of isozyme analysis in fungal taxonomy and genetics. **Mycotaxon**, Ithaca, v.27, p. 405-449, 1986.
- MICHELMORE, R.W.; HULBERT, S.H. Molecular markers for genetic analysis of phytopathogenic fungi. **Ann. Ver. Phytopathol.**, v.25, p. 383-404, 1987.

- MOLINA, R. Ectomycorrhizal inoculation of containerized *Douglas fir* and *Lodgepole pine* seedlings with six isolates of *Pisolithus tinctorius*. **Forest Science**, Bethesda, v.25, p. 585-590, 1979.
- MOLINA, R.; MASSICOTTE, H.; TRAPPE, J.M. Specificity phenomena in mycorrhizal symbiosis: community-ecological consequences and practical implications. In: ALLEN, M.F. (ed.). **Mycorrhizal functioning**. London: Chapman and Hall, 1992. p. 357-423.
- MOLINA, R.; TRAPPE, J.M. Patterns of ectomycorrhizal host specificity and potential among Pacific Northwest conifers and fungi. **Forest Science**, Bethesda, v.28, p. 432-458, 1982.
- MOORE, D.; JIRJIS, R. Electrophoretic studies of carpophore development in the basidiomycete *Coprinus cinereus*. **New Phytologist**, New York, v.87, p. 101-113, 1981.
- MOREIRA, F.M.S.; GILLIS, M.; POT, B.; KERSTERS, K.; FRANCO, A.A. Characterization of rhizobia isolated from different divergence groups of tropical leguminosae by comparative polyacrylamide gel electrophoresis of their total proteins. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v.16, p. 135-146, 1993.
- MORTON, P.F.; BENNY, G.L. Revised classification of arbuscular mycorrhizal fungi (Zigomycetes): a new order, Glomales, two new suborders, Glomineae and Gigasporineae, and two new families, Acaulosporaceae and Gigasporaceae, with an emendation of Glomaceae. **Micotaxon**, Ithaca, v.37, p. 471-91, 1990.
- NEWTON, A.C. Markers in pathogen populations. In: DAY, P.R.; JELLIS, G.J. **Genetic and plant pathogenesis**. Oxford: Blackwell Scientific, 1987. p. 187-194.
- OKUNISHI, M.; YAMADA, K.; KOMAGATA, K. Electrophoretic comparison of enzymes from basidiomycetes in different stages of development. **Journal of General and Applied Microbiology**, Tokyo, v.25, p. 329-334, 1979.
- OTOSINA, W.J.; COBBS JUNIOR, F.W. Analysis of allozymes of three distinct variants of *Verticicladiella wageneri* in Western North America. **Phytopathology**, Lancaster, v.77, p. 1360-1363, 1987.

- PACIONI, G.; POMPONI, G. Chemotaxonomy of some Italian species of *Tuber*. **Micol Veget. Medit.**, v.4, p. 63-72, 1989.
- PACIONI, G.; POMPONI, G. Genotypic patterns of some Italian populations of the *Tuber aestivum-T. mesentericum* complex. **Mycotaxon**, Ithaca, v.42, p. 171-179, 1991.
- PARANJPE, M.S.; CHEN, P.K.; JONG, S.C. Morphogenesis of *Agaricus bisporus*; changes in protein and enzyme activity. **Mycologia**, New York, v.71, p. 469-478, 1979.
- PATE, J.S. The mycorrhizal associations: just one of many nutrient acquiring specializations in natural ecosystems. In: ROBSON, A.D.; ABBOTT, N.; MALAJCZUK, N. (eds.). **Management of mycorrhizas in agriculture horticulture and forestry**. Kluwer: Academic Publishers, 1994, p. 1-10.
- PEREIRA, E.G. **Diversidade de rizóbios isolados de diferentes sistemas de uso da terra na Amazônia**. Lavras: UFLA, 2000. Não paginado. (Tese – Doutorado em Microbiologia Agrícola).
- PERRY, D.A.; MOLINA, R.; AMARANTHUS, P. Mycorrhizae, mycorrhizospheres and reforestation: current knowledge and research needs. **Canadian Journal of Forest Research**, Ottawa, v.17, p. 929-940, 1987.
- PROPAWSKI, T.J.; RIBA, G.; JONES, W.A.; AIOUN, A. Variation in isoesterase profiles of geographical populations of *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) isolated from, *Sitona weevils* (Coleoptera: Curculionidae). **Environmental Entomology**, Maryland, v.17, p. 275-279, 1988.
- RAYNER, A.D.M. The challenge of the individualistic mycelium. **Mycologia**, New York, v.83, p. 48-71, 1991.
- REDHEAD, J.G. Ectomycorrhizae in the tropics. In: DOMMERGUES, Y.R.; DIEM, H.L. (eds.). **Microbiology of tropical soils and plant productivity**. The Hague: M. Nijhoff & W. Junk Publishers, 1982. p. 253-269.

- RIBA, G.; SOARES JUNIOR, G.G.; SAMSOM, R.A.; ONILLON, J.; CAUDAL, A. Isoenzyme analysis of isolates of the entomogeneous fungi. *Tolypocladium cylindrosporum* and *Tolypocladium extonguens* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) entomogenous fungi. **Journal of the Invertebrate Pathology**, v. 48, p. 362-367, 1986.
- ROHLF, F.J. **Numerical taxonomy and multivariate analysis system**: version 1.70. New York: [s.n.], 1992. 470p.
- ROSADO, S.C.S; KROPP, B.R.; PICHÉ, Y. Genetics of ectomycorrhizal symbiosis. II.Fungal variability and heritability of ectomycorrhizal traits. **New Phytologist**, New York, v.126, p. 111-117, 1994.
- ROSSI, I.; BATOLACCI, B.; POTENZA, L.; BERTINI, L.; BARBIERI, E.; STOCCHI, V. Identification of white species using RAPD markers. **Plant and Soil**, The Hague, v.219, p. 127-133, 2000.
- ROYSE, D.J.; JODON, M.H.; ANTOUN, G.G.; MAY, B.P. Confirmation of intraespecific crossing and single and segregation of biochemical loci of *Volvariella volvacea*. **Experimental Mycology**, Orlando, v.11, p. 11-18, 1987.
- ROYSE, D.J.; MAY, B. Genetic relatedness and its application in selective breeding of *Agaricus brunnescens*. **Mycologia**, New York, v.74, p. 569-575, 1982a.
- ROYSE, D.J.; MAY, B. Identification of shiitake genotypes by multilocus enzyme electrophoresis: catalog of lines. **Biochemical Genetics**, New York, v.25, p. 705-716, 1987.
- ROYSE, D.J.; MAY, B. Use of isozyme variaton to identify genotypic classes of *Agaricus brunnescens*. **Mycologia**, New York, v.74, p. 93-102, 1982b.
- ROYSE, D.J.; SPEAR, M.C.; MAY, B. Cell line authentication and genetic relatedness of lines of the shiitake mushroom, *Lentinus edodes*. **Journal of General and Applied Microbiology**, Tokyo, v.29, p. 205-216, 1983.
- SAIK, R.K.; GELFAND, D.H.; STOFFEL, S.; SCHARF, S.J.; HIGUCHI, R.; HORN, G.T.; MULLIS, K.B.; ERLICH, H.A. Primer directed enzymatic amplications of DNA with a tehrmostable DNA polynerase. **Science**, Washington, v.239, p. 487-491, 1988.

- SAIK, R.K.; SCHARF, S.J.; FALOONA, F.; MULLIS, K.B.; HORN, G.T.; ERLICH, H.A.; ARNHEIN, N. Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis fo sickle cell anemia. *Science*, Washington, v.230, p. 1350-1354, 1985.
- SAMSON, J.; FORTIN, J.A. Ectomycorrhizal fungi of *Larix laricina* and the interspecific and intraspecific variation in reponse to temperature. *Canadian Journal of Botany*, Ottawa, v.64, p. 3020-3028, 1986.
- SCHAFER, C.; WOSTERMEYER, J. Randon primer dependent PCR diffrentia tes aggressive from non aggressive isolates of (*Leptosphaeria maculans*). *Phytopatology*, Lancaster, v.136, p. 124-136, 1992.
- SEN, R. Intraspecific variation in two species of *Suillus* from Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) forest based on somatic incompatibility and isozyme analysis. *New Phytologist*, New York, v.114, p. 607-616, 1990.
- SEN, R.; HEPPEL, C.M. Characterization of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi (*Glomus* spp.) by selective enzyme staining following polyacrilamide gel electrophoresis. *Soil Biology and Biochemistry*, Oxford, v.18, p. 29-34, 1986.
- SHATTOCK, R.C.; TOOLEY, P.W.; FRY, W.E. Genetics of *Phytophthora infestans*: determination of recombination, segregation, and selfing by isozyme analysis. *Phytopathology*, Lancaster, v.76, p. 410-413, 1986.
- SILVEIRA, S.F. **Etiologia e controle da mela de estacas e queima de folhas de eucalipto, causadas por *Rhizoctonia* spp.** [S.l.]: [s.n.], 1996. 146p.
- SILVEIRA, S.F.; RIBAS, L.A.; ALFENAS, A.C. Segregação aloenzimática e heterocariotização *in vitro* de *Rhizoctonia solani* AG-1. **Fitopatologia Brasileira**, Brasillia, v.21, p. 380, 1996.
- SINGER, R.; ARAÚJO, I.J.S. Litter decomposition and ectomycorrhiza in Amazonian forests. *Acta Amazonica*, Manaus, v.9, p. 25-41, 1979.
- SIQUEIRA, J.O.; FRANCO, A.A. **Biotechnologia do solo: fundamentos e perspectivas.** Brasília: MEC/ABEAS, 1988. 236p.
- SLICE, D.E.; KIM, J.; WALKER, J. **Ntsys-Numerical taxonomy and Multivariate Analysis System: versão 1.80.** [S.l.]: [s.n.], 1994. Não paginado.

- SMITH, R.A. Nutricional study of *Pisolithus tinctorius*. **Mycologia**, New York, v.74, p. 54-58, 1982.
- SOARES, I.; BORGES, A.C.; BARROS, N.F.; BELLEI, M.M. Níveis de fósforo na formação de ectomicorrizas em mudas de eucalipto. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v.14, p. 327-332, 1990.
- SOARES, I.; BORGES, A.C.; BARROS, N.F.; NEVES, J.C.L.; BELLEI, M.M. Teor de fósforo no solo influenciando o desenvolvimento de ectomicorrizas, nutrição e crescimento de mudas de eucalipto. **Revista Árvore**, Viçosa, v.13, p. 140-151, 1989.
- STASZ, T.E.; NIXON, K.; KUTER, G.A. Evaluation of phenetic species and phylogenetic relationship in the genus *Trichoderma* by cladistic analysis of isozyme polymorphism. **Mycologia**, New York, v. 81, p. 391-403, 1989.
- STASZ, T.E.; WEEDEN, N.F.; HARMAN, G.E. Methods of isozyme electrophoresis for *Trichoderma* and *Gliocladium* species. **Mycologia**, New York, v. 80, p. 870-874, 1989.
- STENLID, J. Populations structure of *Heterobasidion annosum* as determined by somatic incompatibility, sexual incompatibility, and isozyme patterns. **Canadian Journal of Botany**; Ottawa, v.63, p. 2268-2273, 1985.
- TABER, W.A.; TABER, R.A. Carbon nutrition and respiration of *Pisolithus tinctorius*. **Transactions British Mycological Society**, London. v.89, p. 13-26, 1987.
- TANKSLEY, S.D.; ORTON, T.J. (eds). **Isozymes in plant genetics and breeding: part A**. Amsterdam: Elsevier Scientific, 1983. 516p.
- THOMAZINI, L.I. Mycorrhiza in plants of the "Cerrado". **Plant and Soil**, Dordrecht, v.41, p. 707-711, 1974.
- THOMPSON, W.; RAYNER, A.D.M. Spatial structure of a population of *Tricholomopsis platyphylla* in a woodland site. **New Phytologist**, New York, v.92, p. 103-114, 1982.
- THOMSON, B.D.; GROVE, T.S. MALAJCZUK, N. The effectiveness of ectomycorrhizal fungi in increasing the growth of *Eucalyptus globulus* Labill, in relation to root colonization na hyphal development in soil. **New Phytologist**, New York, v.126, p. 517-524, 1994.

- TIBBETT, M.; SANDERS, F.E.; CAIRNEY, J.W.G. The effect of temperature and inorganic phosphorus supply on growth and acid phosphatase production in arctic and temperate strains of ectomycorrhizal *Hebeloma* spp. in axenic culture. **Mycological Research**, Cambridge, v.102, p. 129-135, 1998.
- TIMONEN, S.; SEN, R. Heterogeneity of fungal and plant enzyme expression in intact Scots pine-*Suillus bovinus* and *-Paxillus involutus* mycorrhizospheres developed in natural forest humus. **New Phytologist**, New York, v.138, p. 355-366, 1998.
- TIMONEN, S.; TAMMI, H.; SEM, R. Outcome of interactions between genets of two *Suillus* spp., and different *Pinus sylvestris* genotype combinations: identity and distribution of ectomycorrhizas and effects on early seedling growth in N-limited nursery soil. **New Phytologist**, New York, v.137, p. 691-702, 1997.
- TOMMERUP, I.C. Genetics of eucalypt ectomycorrhizal fungi. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM OF RECENT TOPICS IN GENETICS, PHYSIOLOGY AND TECHNOLOGY OF BASIDIOMYCETES, 1992, Chiba. **Proceedings...** Chiba: Chiba University, 1992. p. 74-79.
- TOYOMASU, T.; MATSUMOTO, T.; MORI, K.I. Interspecific protoplast fusion between *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus salmoneo-stramineus*. **Agricultural and Biological Chemistry**, Tokyo, v.50, p. 223-225, 1986.
- TRAPPE, J.M. Selection of fungi for inoculation in nurseries. **Ann. Ver. Phytopathol.**, v.15, p. 203-222, 1977.
- ULLRICH, R.E. Isozyme patterns and cellular differentiation in *Schizophyllum*. **Molec. Gen. Gent.**, v.156, p. 157-161, 1977.
- VERNETTI, F.J. (Coord.). **Soja: genética e melhoramento**. Campinas: Fundação Cargill, 1983. v 2, 736p.
- VILLENEUVE, N.; GRANDTNER, M.M.; FORTIN, J.A. Frequency and diversity of ectomycorrhizal and saprophytic fungi in the Laurentide mountains of Quebec. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v.67, p. 2616-2629, 1989.

- VOGT, K.A.; PUBLICOVER, D.A.; VOGT, D.J. A critique of the role of ectomycorrhizas in forest ecology. **Agricultural and Ecosystem Environmental**, v.35, p. 171-190, 1991.
- WANG, C.S.; RAPER, J.R. Isozyme patterns and sexual morphogenesis in *Schizophyllum*. **Proc. Natl. Acad. USA**, v.66, p. 882-889, 1970.
- WATLING, R.; TAYLOR, A.; LEE, S.S.; SIMS, K.L ; ALEXANDER, I.J. A rainforest *Pisolithus*; its taxonomy and ecology. **Nova Hedwigia**, v.61, p. 417-429, 1995.
- WESTERMEIER, R.; BARNES, N.; GRONAU-CZY BOLKA, S. et al. **Electrophoresis in practice: a guide to theory and practice**. New York: VCH, 1993. 227p.
- WILCOX, H.E. Mycorrhizal associations. In: NAKAS, J.P.; HAGERDORN, C., (eds.). **Biotechnology of plant-microbe interactions**. New York: McGraw-Hill, 1990. p. 227-255.
- WILLIAMS, J.G.K.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K.J.; RAFALSKI, J.A.; TINGEY, S.V. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, v.18, p. 6531-6535, 1990.
- WONG, K.K.Y.; FORTIN, J.A. Root colonization and intraespecific mycobiont variation in ectomycorrhiza. **Symbiosis**, Rehovot, v.8, p. 197-231, 1990.
- WONG, K.K.Y., PICHÉ, Y.; FORTIN, J.A. Differential development of root colonisation among four closely related genotypes of ectomycorrhizal *Laccaria bicolor*. **Mycological Research**, Cambridge, v.94, p. 876-884, 1990.
- WONG, K.K.Y., PICHÉ, Y., MONTPETIT, D.; KROPP, B.R. Differences in the colonisation of *Pinus banksiana* roots by sib-monokaryotic and dikaryotic strains of ectomycorrhizal *Laccaria bicolor*. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v.67, p. 1717-1726, 1989.
- YOKOMIZO, N.K.S., KRÜGNER, T.L. *Pisolithus tinctorius* Coker et Couch e ectomicorrizas em espécies de *Eucalyptus* L'Heritier. **Revista do Instituto Florestal**, v. 17, n. 19, não paginado, 1985.

- ZAMBINO, P.J.; HARRINGTON, T.C. Isozyme variation within and among host specialized varieties of *Leptographium wageneri*. **Mycologia**, New York, v.81, p. 122-133, 1989.
- ZHIHUZ, Z.; MAKOTO, M.; TAIZO, H. Analysis of genetic structure of a *Suillus grevillei* population in a *Larix Kaempferi* stand by polymorphism of inter-simple sequence repeat (ISSR). **New Phytologist**, New York, v.144, p. 55-63, 1999.
- ZHU, H.; HIGGINBOTHAM, K.O.; DANCİK, B.P.; NAVRATIL, S. Intraspecific genetic variability of isozymes in the ectomycorrhizal fungus *Suillus tomentosus*. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v.66, p. 588-594, 1988.

7 ANEXOS

TABELA 1A – Teste de TuKey para as avaliações de crescimento; isolados seguidos de mesma letra não diferem a 5% de probabilidade

Isolados	7 dias de cultivo		14 dias de cultivo		21 dias de cultivo		28 dias de cultivo	
	Médias	Teste	Médias	Teste	Médias	Teste	Médias	Teste
P1	0.362	DEFG	1.137	CDEFGHIJ	1.787	CDEFGH	2.575	GHIJKLM
P2	0.850	ABCDEF	1.462	ABCDEFGHIJ	2.200	ABCDEFGH	2.950	FGHIJKLMN
P3	0.600	ABCDEFG	1.075	CDEFGHIJ	1.450	DEFGH	1.725	LM
P4	1.087	ABCD	2.525	AB	3.775	ABC	4.637	ABCDE
P5	1.172	A	2.180	ABCD	3.087	ABCDEF	4.00	BCDEFGHI
P6	1.025	ABCD	1.875	ABCDEF	2.487	ABCDEFG	3.125	FGHIJKLM
P7	0.237	EFG	0.850	DEFGHIJ	1.400	DEFGH	2.025	KLM
P8	0.00	G	0.387	HIJ	0.725	GH	2.162	IJKLM
P9	0.725	ABCDEFG	1.450	ABCDEFGHIJ	2.287	ABCDEFGH	3.362	BCDEFGHIJKLM
P10	1.075	ABCD	2.612	AB	4.250	A	6.012	A
P11	0.400	BCDEFG	1.150	CDEFGHIJ	1.800	BCDEFGH	2.512	GHIJKLM
P12	1.037	ABCD	2.087	ABCDE	3.337	ABCD	3.837	BCDEFGHI
P13	1.00	ABCDE	2.075	ABCDE	2.887	ABCDEFG	3.487	BCDEFGHIJKL
P14	0.812	ABCDEF	1.875	ABCDE	3.300	ABCD	4.912	ABC
P15	0.00	G	0.200	J	0.462	H	1.325	M
P16	0.00	G	0.412	GHIJ	1.287	DEFGH	3.275	CDEFGHIJKLM
P17	0.625	ABCDEFG	1.725	ABCDEFGH	3.012	ABCDEF	4.587	ABCDEF
P18	0.887	ABCDEF	1.775	ABCDEFG	1.712	CDEFGH	4.075	BCDEFGH
P19	0.987	ABCDE	1.962	ABCDE	2.962	ABCDEFG	3.650	BCDEFGHIJKL
P20	0.700	ABCDEFG	1.525	ABCDEFGHIJ	2.725	ABCDEFG	3.275	CDEFGHIJKLM
P21	0.907	ABCDE	1.682	ABCDEFGHI	2.402	ABCDEFG	3.137	FGHIJKLM
P22	0.450	ABCDEFG	0.787	EFGHIJ	1.625	DEFGH	2.125	JKLM
P23	0.00	G	1.412	ABCDEFGHIJ	2.512	ABCDEFGH	4.275	BCDEFG
P24	0.562	ABCDEFG	1.325	ABCDEFGHIJ	2.087	ABCDEFGH	3.262	DEFGHIJKLM
P25	0.750	ABCDEFG	1.350	ABCDEFGHIJ	1.675	CDEFGH	2.075	KLM
P26	0.125	FG	0.525	FGHIJ	1.00	EFGH	3.037	FGHIJKLM
P27	0.775	ABCDEF	1.650	ABCDEFGHI	2.312	ABCDEFG	2.600	GHIJKLM
P28	0.975	ABCDE	1.975	ABCDE	2.475	ABCDEFG	2.887	FGHIJKLM
P29	0.00	G	0.350	IJ	0.462	H	2.100	KLM
P30	0.00	G	0.250	J	0.862	FGH	2.375	HIJKLM
P31	0.387	CDEFG	1.625	ABCDEFGHI	3.212	ABCDE	4.787	ABCD
P32	0.812	ABCDEF	1.250	BCDEFGHIJ	1.562	CDEFGH	3.387	BCDEFGHIJKL
P33	1.125	ABCD	2.312	ABC	3.187	ABCDE	3.787	BCDEFGHIJ
P34	1.137	ABC	2.162	ABCD	2.800	ABCDEFG	3.587	BCDEFGHIJKL
P35	1.162	AB	2.237	ABC	3.212	ABCDE	3.762	BCDEFGHIJK
P36	1.175	A	1.925	ABCDE	2.512	ABCDEFG	3.00	FGHIJKLM
P37	1.075	ABCD	2.675	A	4.050	AB	4.937	AB

TABELA 1B - Matriz de dissimilaridade obtida a partir das análises morfológicas de diferentes isolados de *Pisolithus* spp.

Isolados	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11
P1	0,00										
P2	0,37	0,00									
P3	0,28	0,10	0,00								
P4	0,73	0,73	0,73	0,00							
P5	0,37	0,46	0,55	0,46	0,00						
P6	0,37	0,64	0,64	0,28	0,37	0,00					
P7	0,37	0,28	0,37	0,64	0,55	0,73	0,00				
P8	0,37	0,10	0,19	0,64	0,55	0,64	0,19	0,00			
P9	0,37	0,19	0,28	0,64	0,55	0,55	0,46	0,28	0,00		
P10	0,46	0,55	0,64	0,37	0,28	0,64	0,55	0,64	0,64	0,00	
P11	0,37	0,37	0,37	0,28	0,19	0,55	0,37	0,46	0,46	0,19	0,00
P12	0,46	0,46	0,37	0,28	0,19	0,19	0,46	0,46	0,64	0,46	0,37
P13	0,55	0,55	0,55	0,19	0,28	0,28	0,46	0,55	0,64	0,46	0,37
P14	0,64	0,64	0,64	0,00	0,37	0,37	0,55	0,64	0,73	0,37	0,46
P15	0,37	0,10	0,19	0,73	0,46	0,64	0,19	0,00	0,37	0,64	0,46
P16	0,72	0,28	0,28	0,55	0,10	0,46	0,46	0,37	0,37	0,28	0,10
P17	0,46	0,55	0,55	0,46	0,28	0,64	0,55	0,64	0,64	0,00	0,19
P18	0,55	0,73	0,73	0,19	0,46	0,10	0,64	0,73	0,64	0,55	0,46
P19	0,55	0,55	0,46	0,19	0,28	0,28	0,46	0,64	0,37	0,46	0,28
P20	0,28	0,28	0,28	0,64	0,37	0,55	0,37	0,37	0,28	0,64	0,46
P21	0,37	0,19	0,28	0,82	0,46	0,64	0,28	0,10	0,46	0,46	0,55
P22	0,28	0,00	0,10	0,73	0,46	0,73	0,28	0,10	0,10	0,55	0,37
P23	0,46	0,46	0,46	0,37	0,37	0,55	0,37	0,46	0,55	0,28	0,10
P24	0,46	0,55	0,55	0,28	0,55	0,55	0,37	0,55	0,64	0,28	0,28
P25	0,10	0,28	0,28	0,82	0,46	0,55	0,37	0,37	0,28	0,55	0,46
P26	0,28	0,19	0,28	0,64	0,55	0,46	0,37	0,19	0,37	0,64	0,55
P27	0,19	0,10	0,10	0,64	0,46	0,64	0,19	0,10	0,28	0,55	0,37
P28	0,28	0,28	0,28	0,55	0,46	0,73	0,19	0,28	0,28	0,46	0,28
P29	0,28	0,37	0,28	0,55	0,64	0,64	0,28	0,37	0,10	0,46	0,37
P30	0,37	0,37	0,37	0,46	0,28	0,64	0,37	0,46	0,46	0,19	0,00
P31	0,55	0,55	0,55	0,46	0,64	0,64	0,46	0,64	0,46	0,37	0,37
P32	0,37	0,55	0,55	0,46	0,73	0,46	0,28	0,55	0,37	0,64	0,55
P33	0,73	0,64	0,64	0,19	0,55	0,28	0,55	0,64	0,46	0,64	0,46
P34	0,64	0,64	0,64	0,19	0,55	0,28	0,55	0,73	0,46	0,64	0,46
P35	0,73	0,64	0,64	0,19	0,55	0,28	0,55	0,64	0,46	0,64	0,46
P36	0,46	0,73	0,64	0,46	0,64	0,37	0,46	0,64	0,46	0,73	0,64
P37	0,28	0,37	0,37	0,46	0,46	0,73	0,28	0,46	0,46	0,28	0,28

"...continua..."

"TABELA IB , Cont."

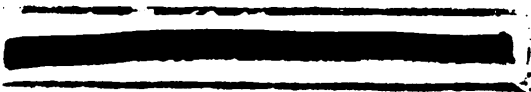
Isolados	P12	P13	P14	P15	P16	P17	P18	P19	P20	P21	P22
P1											
P2											
P3											
P4											
P5											
P6											
P7											
P8											
P9											
P10											
P11											
P12	0,00										
P13	0,10	0,00									
P14	0,19	0,10	0,00								
P15	0,46	0,55	0,64	0,00							
P16	0,28	0,28	0,46	0,37	0,00						
P17	0,55	0,46	0,28	0,64	0,28	0,00					
P18	0,28	0,19	0,28	0,73	0,55	0,55	0,00				
P19	0,28	0,19	0,28	0,64	0,37	0,46	0,19	0,00			
P20	0,37	0,46	0,55	0,37	0,37	0,64	0,55	0,46	0,00		
P21	0,55	0,64	0,73	0,10	0,46	0,55	0,73	0,73	0,46	0,00	
P22	0,46	0,55	0,64	0,10	0,28	0,55	0,73	0,55	0,28	0,19	0,00
P23	0,28	0,19	0,28	0,46	0,19	0,28	0,37	0,37	0,55	0,55	0,46
P24	0,37	0,28	0,19	0,55	0,28	0,28	0,46	0,46	0,55	0,64	0,55
P25	0,55	0,64	0,73	0,37	0,37	0,55	0,64	0,64	0,19	0,37	0,28
P26	0,46	0,55	0,64	0,19	0,46	0,64	0,55	0,73	0,46	0,19	0,19
P27	0,46	0,55	0,64	0,19	0,28	0,55	0,73	0,55	0,19	0,28	0,10
P28	0,55	0,46	0,55	0,37	0,37	0,46	0,64	0,46	0,19	0,46	0,28
P29	0,64	0,55	0,64	0,37	0,46	0,55	0,55	0,37	0,28	0,55	0,37
P30	0,37	0,28	0,37	0,46	0,10	0,19	0,46	0,28	0,46	0,55	0,37
P31	0,64	0,55	0,46	0,64	0,46	0,28	0,55	0,37	0,55	0,73	0,55
P32	0,64	0,55	0,64	0,55	0,64	0,64	0,37	0,55	0,46	0,55	0,55
P33	0,28	0,19	0,28	0,64	0,55	0,64	0,19	0,19	0,46	0,73	0,64
P34	0,28	0,19	0,28	0,64	0,55	0,64	0,19	0,19	0,46	0,73	0,64
P35	0,28	0,19	0,28	0,64	0,55	0,64	0,28	0,19	0,46	0,73	0,64
P36	0,55	0,46	0,55	0,64	0,73	0,73	0,37	0,46	0,46	0,64	0,64
P37	0,55	0,46	0,37	0,46	0,37	0,28	0,64	0,46	0,37	0,55	0,37

"...continua..."

“TABELA 1B , Cont.”

Isolados	P23	P24	P25	P26	P27	P28	P29	P30	P31	P32	P33
P1											
P2											
P3											
P4											
P5											
P6											
P7											
P8											
P9											
P10											
P11											
P12											
P13											
P14											
P15											
P16											
P17											
P18											
P19											
P20											
P21											
P22											
P23	0,00										
P24	0,19	0,00									
P25	0,55	0,46	0,00								
P26	0,46	0,46	0,28	0,00							
P27	0,46	0,37	0,19	0,28	0,00						
P28	0,37	0,28	0,19	0,46	0,19	0,00					
P29	0,46	0,37	0,28	0,55	0,28	0,10	0,00				
P30	0,10	0,19	0,46	0,55	0,37	0,28	0,37	0,00			
P31	0,46	0,37	0,55	0,73	0,46	0,37	0,37	0,37	0,00		
P32	0,55	0,37	0,28	0,37	0,46	0,28	0,19	0,55	0,46	0,00	
P33	0,37	0,37	0,64	0,64	0,64	0,46	0,37	0,46	0,46	0,37	0,00
P34	0,37	0,37	0,64	0,64	0,64	0,46	0,37	0,46	0,46	0,37	0,00
P35	0,37	0,37	0,64	0,64	0,64	0,46	0,37	0,46	0,46	0,37	0,00
P36	0,55	0,46	0,37	0,46	0,55	0,37	0,28	0,64	0,46	0,28	0,28
P37	0,37	0,28	0,37	0,55	0,28	0,19	0,28	0,37	0,28	0,46	0,64

“...continua...”



"TABELA IB , Cont."

Isolados	P34	P35	P36	P37
P1				
P2				
P3				
P4				
P5				
P6				
P7				
P8				
P9				
P10				
P11				
P12				
P13				
P14				
P15				
P16				
P17				
P18				
P19				
P20				
P21				
P22				
P23				
P24				
P25				
P26				
P27				
P28				
P29				
P30				
P31				
P32				
P33				
P34	0,00			
P35	0,00	0,00		
P36	0,58	0,28	0,00	
P37	0,64	0,55	0,55	0,00

TABELA 1C - Matriz de dissimilaridade obtida a partir das análises dos perfis de polipeptídeos dos diferentes isolados de *Pisolithus* spp.

Isolados	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11
P1	0,00										
P2	0,43	0,00									
P3	0,68	0,56	0,00								
P4	0,43	0,37	0,31	0,00							
P5	0,25	0,37	0,56	0,25	0,00						
P6	0,25	0,31	0,50	0,31	0,12	0,00					
P7	0,37	0,37	0,50	0,43	0,43	0,37	0,00				
P8	0,43	0,37	0,56	0,43	0,37	0,31	0,37	0,00			
P9	0,46	0,40	0,39	0,53	0,40	0,45	0,40	0,28	0,00		
P10	0,50	0,43	0,43	0,37	0,56	0,56	0,37	0,50	0,46	0,00	
P11	0,40	0,28	0,46	0,46	0,53	0,46	0,34	0,34	0,37	0,40	0,00
P12	0,43	0,18	0,50	0,37	0,37	0,37	0,43	0,43	0,34	0,56	0,28
P13	0,31	0,37	0,36	0,50	0,50	0,50	0,50	0,37	0,40	0,43	0,28
P14	0,40	0,28	0,59	0,46	0,46	0,53	0,46	0,34	0,43	0,40	0,25
P15	0,50	0,56	0,50	0,50	0,50	0,56	0,56	0,37	0,46	0,50	0,53
P16	0,34	0,46	0,59	0,53	0,46	0,46	0,46	0,34	0,43	0,46	0,37
P17	0,43	0,37	0,56	0,50	0,43	0,37	0,37	0,25	0,46	0,50	0,28
P18	0,31	0,31	0,62	0,37	0,25	0,31	0,43	0,37	0,46	0,56	0,40
P19	0,40	0,34	0,40	0,40	0,40	0,4	0,46	0,46	0,50	0,46	0,31
P20	0,40	0,46	0,53	0,46	0,34	0,46	0,4	0,34	0,43	0,40	0,37
P21	0,40	0,65	0,53	0,46	0,40	0,40	0,59	0,46	0,56	0,53	0,5
P22	0,37	0,50	0,56	0,50	0,43	0,50	0,43	0,37	0,34	0,43	0,34
P23	0,31	0,31	0,56	0,50	0,43	0,43	0,25	0,43	0,40	0,43	0,15
P24	0,25	0,31	0,62	0,43	0,37	0,43	0,31	0,43	0,46	0,43	0,28
P25	0,56	0,37	0,50	0,43	0,31	0,50	0,56	0,56	0,40	0,43	0,34
P26	0,59	0,52	0,53	0,58	0,53	0,59	0,59	0,65	0,43	0,65	0,43
P27	0,50	0,56	0,50	0,50	0,56	0,56	0,37	0,43	0,46	0,50	0,34
P28	0,53	0,34	0,59	0,53	0,46	0,59	0,53	0,59	0,43	0,53	0,43
P29	0,59	0,53	0,40	0,46	0,53	0,53	0,46	0,53	0,50	0,40	0,50
P30	0,59	0,65	0,40	0,53	0,53	0,53	0,40	0,53	0,50	0,46	0,43
P31	0,46	0,59	0,53	0,46	0,53	0,59	0,59	0,53	0,43	0,71	0,43
P32	0,59	0,53	0,40	0,40	0,46	0,53	0,65	0,53	0,43	0,53	0,56
P33	0,59	0,40	0,34	0,28	0,40	0,53	0,65	0,53	0,50	0,40	0,50
P34	0,56	0,50	0,43	0,37	0,50	0,56	0,68	0,56	0,53	0,43	0,59
P35	0,50	0,50	0,50	0,37	0,43	0,43	0,62	0,62	0,65	0,50	0,59
P36	0,46	0,40	0,40	0,46	0,40	0,46	0,40	0,46	0,50	0,46	0,43
P37	0,53	0,34	0,65	0,50	0,34	0,53	0,64	0,32	0,65	0,25	0,32

"...continua..."

“TABELA 1C. Cont.”

Isolados	P12	P13	P14	P15	P16	P17	P18	P19	P20	P21	P22
P1											
P2											
P3											
P4											
P5											
P6											
P7											
P8											
P9											
P10											
P11											
P12	0,00										
P13	0,43	0,00									
P14	0,46	0,09	0,00								
P15	0,50	0,31	0,34	0,00							
P16	0,46	0,09	0,18	0,21	0,00						
P17	0,50	0,26	0,21	0,37	0,21	0,00					
P18	0,37	0,25	0,21	0,43	0,28	0,31	0,00				
P19	0,40	0,21	0,18	0,40	0,31	0,28	0,28	0,00			
P20	0,53	0,28	0,18	0,28	0,25	0,21	0,28	0,18	0,00		
P21	0,59	0,46	0,50	0,24	0,43	0,40	0,40	0,43	0,31	0,00	
P22	0,34	0,18	0,21	0,25	0,15	0,25	0,25	0,21	0,15	0,34	0,00
P23	0,15	0,25	0,21	0,56	0,34	0,25	0,31	0,21	0,28	0,53	0,31
P24	0,26	0,25	0,15	0,50	0,34	0,31	0,18	0,21	0,21	0,46	0,31
P25	0,34	0,50	0,46	0,50	0,53	0,50	0,56	0,40	0,40	0,46	0,43
P26	0,43	0,53	0,56	0,53	0,50	0,53	0,59	0,56	0,62	0,43	0,53
P27	0,34	0,50	0,40	0,50	0,46	0,37	0,43	0,46	0,40	0,46	0,30
P28	0,43	0,40	0,37	0,53	0,37	0,40	0,46	0,50	0,46	0,62	0,46
P29	0,50	0,71	0,62	0,46	0,62	0,53	0,78	0,68	0,56	0,50	0,65
P30	0,43	0,71	0,62	0,53	0,62	0,46	0,65	0,62	0,50	0,43	0,59
P31	0,43	0,40	0,50	0,46	0,43	0,53	0,53	0,56	0,80	0,43	0,46
P32	0,56	0,59	0,63	0,40	0,56	0,53	0,53	0,56	0,56	0,43	0,53
P33	0,50	0,53	0,50	0,40	0,50	0,59	0,53	0,50	0,50	0,50	0,53
P34	0,59	0,50	0,53	0,31	0,46	0,62	0,50	0,53	0,53	0,46	0,50
P35	0,59	0,56	0,59	0,50	0,53	0,56	0,50	0,53	0,59	0,34	0,56
P36	0,43	0,53	0,43	0,46	0,56	0,46	0,46	0,31	0,31	0,43	0,46
P37	0,54	0,42	0,23	0,54	0,50	0,31	0,25	0,40	0,62	0,55	0,35

“...continua...”

“TABELA IC . Cont.”

Isolados	P23	P24	P25	P26	P27	P28	P29	P30	P31	P32	P33
P1											
P2											
P3											
P4											
P5											
P6											
P7											
P8											
P9											
P10											
P11											
P12											
P13											
P14											
P15											
P16											
P17											
P18											
P19											
P20											
P21											
P22											
P23	0,00										
P24	0,12	0,00									
P25	0,37	0,50	0,00								
P26	0,46	0,58	0,28	0,00							
P27	0,37	0,37	0,43	0,40	0,00						
P28	0,40	0,40	0,34	0,31	0,59	0,00					
P29	0,59	0,65	0,40	0,43	0,40	0,50	0,00				
P30	0,46	0,53	0,46	0,42	0,28	0,46	0,12	0,00			
P31	0,53	0,53	0,46	0,31	0,46	0,43	0,56	0,56	0,00		
P32	0,65	0,59	0,40	0,37	0,53	0,43	0,50	0,50	0,43	0,00	
P33	0,58	0,59	0,34	0,37	0,53	0,43	0,43	0,56	0,40	0,25	0,00
P34	0,68	0,56	0,43	0,46	0,50	0,53	0,53	0,59	0,40	0,15	0,15
P35	0,56	0,50	0,37	0,34	0,56	0,46	0,53	0,53	0,62	0,21	0,28
P36	0,37	0,37	0,40	0,50	0,40	0,56	0,50	0,43	0,31	0,43	0,37
P37	0,42	0,23	0,54	0,32	0,56	0,45	0,12	0,34	0,65	0,32	0,21

“...continua...”

"TABELA 1C. Cont."

Isolados	P34	P35	P36	P37
P1				
P2				
P3				
P4				
P5				
P6				
P7				
P8				
P9				
P10				
P11				
P12				
P13				
P14				
P15				
P16				
P17				
P18				
P19				
P20				
P21				
P22				
P23				
P24				
P25				
P26				
P27				
P28				
P29				
P30				
P31				
P32				
P33				
P34	0			
P35	0.25	0		
P36	0.40	0.46	0	
P37	0.35	0.32	0.43	0

TABELA 1D - Matriz de dissimilaridade obtida a partir das análises dos perfis de polipeptídeos dos diferentes isolados de *Pisolithus* spp.

Isolados	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11
P1	0,00										
P2	0,36	0,00									
P3	0,43	0,21	0,00								
P4	0,43	0,36	0,29	0,00							
P5	0,36	0,14	0,21	0,21	0,00						
P6	0,43	0,36	0,29	0,29	0,21	0,00					
P7	0,36	0,29	0,36	0,64	0,43	0,36	0,00				
P8	0,36	0,43	0,50	0,64	0,57	0,64	0,29	0,00			
P9	0,36	0,43	0,36	0,50	0,43	0,50	0,29	0,29	0,00		
P10	0,50	0,43	0,36	0,36	0,29	0,07	0,43	0,71	0,57	0,00	
P11	0,57	0,64	0,43	0,43	0,50	0,29	0,64	0,64	0,50	0,21	0,00
P12	0,57	0,64	0,43	0,29	0,50	0,29	0,64	0,64	0,64	0,21	0,14
P13	0,57	0,64	0,43	0,29	0,50	0,29	0,64	0,64	0,64	0,21	0,14
P14	0,43	0,50	0,43	0,57	0,50	0,29	0,36	0,64	0,50	0,21	0,43
P15	0,43	0,50	0,57	0,57	0,36	0,57	0,50	0,50	0,36	0,64	0,57
P16	0,36	0,14	0,21	0,36	0,14	0,21	0,43	0,43	0,29	0,29	0,50
P17	0,50	0,29	0,21	0,50	0,29	0,21	0,57	0,57	0,43	0,14	0,36
P18	0,57	0,36	0,29	0,57	0,36	0,29	0,50	0,50	0,50	0,21	0,43
P19	0,57	0,50	0,43	0,57	0,50	0,29	0,50	0,50	0,50	0,21	0,43
P20	0,36	0,57	0,50	0,64	0,57	0,50	0,14	0,14	0,43	0,57	0,50
P21	0,36	0,57	0,50	0,64	0,57	0,50	0,14	0,14	0,43	0,57	0,50
P22	0,36	0,43	0,36	0,36	0,29	0,50	0,29	0,29	0,29	0,57	0,64
P23	0,50	0,57	0,50	0,36	0,57	0,50	0,29	0,29	0,43	0,57	0,50
P24	0,29	0,50	0,43	0,29	0,36	0,43	0,36	0,36	0,36	0,50	0,43
P25	0,29	0,36	0,14	0,29	0,21	0,14	0,50	0,50	0,36	0,21	0,29
P26	0,50	0,43	0,36	0,64	0,43	0,36	0,43	0,43	0,43	0,29	0,50
P27	0,29	0,36	0,14	0,29	0,21	0,14	0,50	0,50	0,36	0,21	0,29
P28	0,50	0,57	0,36	0,64	0,57	0,50	0,29	0,29	0,29	0,43	0,50
P29	0,36	0,43	0,21	0,50	0,43	0,36	0,43	0,43	0,29	0,29	0,36
P30	0,64	0,43	0,36	0,50	0,43	0,21	0,71	0,71	0,43	0,14	0,21
P31	0,36	0,43	0,21	0,50	0,43	0,36	0,43	0,43	0,29	0,29	0,36
P32	0,29	0,36	0,43	0,57	0,50	0,57	0,21	0,21	0,36	0,50	0,57
P33	0,50	0,43	0,64	0,50	0,57	0,50	0,43	0,43	0,57	0,43	0,64
P34	0,50	0,29	0,36	0,36	0,43	0,36	0,57	0,57	0,57	0,43	0,64
P35	0,50	0,29	0,21	0,36	0,29	0,36	0,57	0,57	0,43	0,43	0,64
P36	0,36	0,29	0,21	0,36	0,29	0,50	0,57	0,57	0,43	0,43	0,50
P37	0,43	0,36	0,42	0,57	0,50	0,57	0,21	0,21	0,36	0,50	0,57

"...continua..."

"TABELA ID, Cont."

Isolados	P12	P13	P14	P15	P16	P17	P18	P19	P20	P21	P22
P1											
P2											
P3											
P4											
P5											
P6											
P7											
P8											
P9											
P10											
P11											
P12	0,00										
P13	0,00	0,00									
P14	0,43	0,43	0,00								
P15	0,71	0,71	0,57	0,00							
P16	0,50	0,50	0,36	0,50	0,00						
P17	0,36	0,36	0,21	0,64	0,14	0,00					
P18	0,43	0,73	0,29	0,71	0,21	0,07	0,00				
P19	0,43	0,43	0,14	0,71	0,36	0,21	0,14	0,00			
P20	0,50	0,50	0,64	0,50	0,57	0,57	0,50	0,50	0,00		
P21	0,50	0,50	0,64	0,50	0,57	0,57	0,50	0,50	0,00	0,00	
P22	0,64	0,64	0,64	0,36	0,43	0,57	0,50	0,50	0,29	0,29	0,00
P23	0,36	0,36	0,50	0,64	0,43	0,57	0,50	0,36	0,43	0,43	0,43
P24	0,29	0,29	0,57	0,43	0,36	0,50	0,57	0,57	0,36	0,36	0,36
P25	0,29	0,29	0,43	0,57	0,21	0,21	0,29	0,43	0,36	0,36	0,36
P26	0,50	0,50	0,21	0,64	0,29	0,14	0,07	0,07	0,43	0,43	0,43
P27	0,29	0,29	0,43	0,57	0,21	0,21	0,29	0,43	0,36	0,36	0,36
P28	0,50	0,50	0,36	0,64	0,43	0,29	0,21	0,21	0,29	0,29	0,29
P29	0,36	0,36	0,21	0,64	0,29	0,14	0,21	0,21	0,43	0,43	0,43
P30	0,36	0,36	0,21	0,64	0,29	0,14	0,24	0,21	0,71	0,71	0,71
P31	0,36	0,36	0,21	0,64	0,29	0,14	0,21	0,21	0,43	0,43	0,43
P32	0,57	0,57	0,43	0,71	0,36	0,36	0,29	0,29	0,36	0,36	0,36
P33	0,50	0,50	0,36	0,79	0,43	0,43	0,36	0,21	0,57	0,57	0,57
P34	0,50	0,50	0,36	0,64	0,43	0,43	0,50	0,36	0,57	0,57	0,57
P35	0,50	0,50	0,36	0,50	0,29	0,29	0,36	0,36	0,57	0,57	0,43
P36	0,50	0,50	0,36	0,50	0,29	0,29	0,36	0,50	0,71	0,71	0,43
P37	0,57	0,57	0,43	0,71	0,36	0,36	0,29	0,29	0,36	0,36	0,36

"...continua..."

"TABELA ID, Cont."

Isolados	P23	P24	P25	P26	P27	P28	P29	P30	P31	P32	P33
P1											
P2											
P3											
P4											
P5											
P6											
P7											
P8											
P9											
P10											
P11											
P12											
P13											
P14											
P15											
P16											
P17											
P18											
P19											
P20											
P21											
P22											
P23	0,00										
P24	0,21	0,00									
P25	0,50	0,29	0,00								
P26	0,43	0,50	0,36	0,00							
P27	0,50	0,29	0,00	0,36	0,00						
P28	0,43	0,50	0,36	0,14	0,36	0,00					
P29	0,43	0,36	0,21	0,14	0,21	0,14	0,00				
P30	0,57	0,64	0,36	0,29	0,36	0,43	0,29	0,00			
P31	0,43	0,36	0,21	0,14	0,21	0,14	0,00	0,29	0,00		
P32	0,36	0,43	0,43	0,21	0,43	0,21	0,21	0,50	0,21	0,00	
P33	0,29	0,50	0,64	0,29	0,64	0,43	0,43	0,43	0,43	0,21	0,00
P34	0,43	0,50	0,50	0,43	0,50	0,57	0,43	0,43	0,43	0,50	0,29
P35	0,43	0,36	0,36	0,29	0,36	0,43	0,29	0,43	0,29	0,50	0,43
P36	0,57	0,50	0,36	0,43	0,36	0,43	0,29	0,43	0,29	0,36	0,57
P37	0,36	0,43	0,43	0,21	0,43	0,21	0,21	0,50	0,21	0,00	0,21

"...continua..."

“TABELA 1D . Cont.”

Isolados	P34	P35	P36	P37
P1				
P2				
P3				
P4				
P5				
P6				
P7				
P8				
P9				
P10				
P11				
P12				
P13				
P14				
P15				
P16				
P17				
P18				
P19				
P20				
P21				
P22				
P23				
P24				
P25				
P26				
P27				
P28				
P29				
P30				
P31				
P32				
P33				
P34	0,00			
P35	0,14	0,00		
P36	0,57	0,43	0,00	
P37	0,50	0,50	0,36	0,00